

**JOSIANE CARDOSO**

**ANÁLISE FUNCIONAL DA VIA PROTEOLÍTICA MEDIADA PELO  
PROTEOSSOMO DEPENDENTE DE UBIQUITINA E ATP, EM  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada à coordenação  
do curso de Biologia Celular e Molecular  
da Universidade Federal do Paraná,  
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio  
Krieger.

**Curitiba 2005**

Universidade Federal do Paraná

**Instituto de Biologia Molecular do Paraná**

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISE FUNCIONAL DA VIA PROTEOLÍTICA MEDIADA PELO  
PROTEOSSOMO DEPENDENTE DE UBIQUITINA E ATP, EM  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

por

Josiane Cardoso

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Biologia  
Celular e Molecular

Maio, 2005

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Instituto de Biologia Molecular do Paraná

---

## DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que JOSIANE CARDOSO, defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular intitulada: "*Genômica funcional dos gêneses da via proteolítica mediada pelo proteossomo dependente de ubiquitina e atp, em trypanosoma cruzi*", com a Banca Examinadora: Dr. Marco Aurélio Krieger (Orientador da IBMP-UFPR), Dr. Luiz Roberto Soares (Standord University-IBMP) e Dr<sup>a</sup>. Vanessa S Sotomaior (PUCPR), e tendo sido **APROVADA** recebendo o título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**, desde que apresente a versão definitiva da dissertação conforme regimento interno do programa. Em 16 de maio de 2005, no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 16 de maio de 2004.



Prof. Dr. Silvio Marques Zanata  
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
Biologia Celular e Molecular

Dedico ao meu amado esposo **MARCELO F RIBEIRO** pela colaboração, amor e compreensão e aos meus familiares pelo apoio constante.

Manifesto minha gratidão ao **Dr. Marco Aurélio Krieger** pela confiança na minha capacidade de realização, apoio e orientação.

Agradeço aos **amigos do IBMP** que direta ou indiretamente colaboraram com uma parte deste trabalho, o qual não se realizaria sem a participação de todos.



## SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS .....   | IV  |
| RESUMO.....   | VI  |
| ABSTRACT .....  | VII |
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 1   |
| 1.1 DOENÇA DE CHAGAS E O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....                               | 1   |
| 1.2 METACICLOGÊNESE .....   | 5   |
| 1.3 CARACTERÍSTICA DO GENOMA DO T. CRUZI .....  | 6   |
| 1.4 TRANSCRIÇÃO E O CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA .....                                | 8   |
| 1.5 A GENÔMICA FUNCIONAL E A TECNOLOGIA DO MICROARRANJO .....                         | 10  |
| 1.6 VIA PROTEOLÍTICA MEDIADA PELO PROTEOSSOMO DEPENDENTE DE<br>ATP E UBIQUITINA ..... | 14  |
| 2. OBJETIVOS .....  | 21  |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 22  |
| 3.1 REAGENTES E PROCEDÊNCIA: .....  | 22  |
| 3.1.1 Amersham-Parmacia Biotech .....   | 22  |
| 3.1.2 Applied Biosystems .....  | 22  |
| 3.1.3 Bio Rad.....  | 22  |
| 3.1.4 Invitrogen.....   | 22  |
| 3.1.5 Life technologies.....  | 22  |
| 3.1.6 MERCK.....  | 23  |
| 3.1.7 Millipore .....   | 23  |
| 3.1.8 New England Biolabs .....   | 23  |
| 3.1.9 Promega.....  | 23  |
| 3.1.10 Qiagen.....  | 23  |
| 3.1.11 Roche Molecular Biochemicals .....   | 24  |
| 3.1.12 Sigma.....   | 24  |
| 3.1.13 Whatman.....   | 24  |
| 3.2 MEIOS DE CULTURA.....   | 24  |
| 3.2.1 Meio LB.....  | 24  |
| 3.2.2 Meio LB ágar .....  | 24  |
| 3.2.3 Meio LIT (liver infusion tryptose) .....  | 25  |
| 3.2.4 Meio TAU (triatomine artificial urine) .....                                    | 25  |
| 3.2.5 Meio TAU 3AAG.....  | 25  |
| 3.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....   | 25  |
| 3.3.1 Colchão de sacarose.....  | 25  |
| 3.3.2 Clorofórmio/álcool isoamílico.....  | 25  |
| 3.3.3 Fenol clorofórmio .....   | 26  |
| 3.3.4 Solução para hibridação no microarranjo de DNA.....                             | 26  |
| 3.3.5 Solução para lavagem do microarranjo de DNA .....                               | 26  |
| 3.3.6 Solução para ressuspensão dos polissomas.....                                   | 26  |
| 3.3.7 Tampão de lise.....   | 26  |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.8 Tampão hipotônico de lise .....   | 26        |
| 3.3.9 Tampão MOPS.....  | 27        |
| 3.3.10 Tampão PBS.....  | 27        |
| 3.3.11 Tampão TBE (10X) .....   | 27        |
| 3.3.12 Tampão TE.....   | 27        |
| 3.4 MICROORGANISMO .....  | 27        |
| 3.4.1 <i>Escherichia coli</i> .....   | 27        |
| 3.4.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 27        |
| 3.4.3 Biblioteca de cDNA.....   | 29        |
| 3.5 ISOLAMENTO DAS FRAÇÕES DE RNA .....   | 29        |
| 3.5.1 Isolamento de RNA total.....  | 30        |
| 3.5.2 Isolamento de RNA associados aos polissomas.....  | 30        |
| 3.7 CONFECÇÃO DO MICROARRANJO .....   | 31        |
| 3.7.1 Amplificação do DNA oriundo da seleção de seqüências codificadores do <i>T.cruzi</i> .....  | 32        |
| 3.7.2 Purificação do DNA .....  | 33        |
| 3.7.3 Hibridação das amostras extraídas do parasita em diferentes estágios evolutivos: .....  | 33        |
| 3.8 LEITURA DOS SINAIS OBTIDOS .....  | 35        |
| 3.9 ANÁLISE DAS IMAGENS .....   | 35        |
| 3.10 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS .....   | 36        |
| 3.11 RECONHECIMENTO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS .....   | 37        |
| 3.12 BUSCA SISTEMÁTICA DOS GENES DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSSOMO NO BANCO DE DADOS DE <i>T. CRUZI</i> .....                                 | 37        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>  | <b>39</b> |
| 4.1 ANÁLISE DOS GENES DO SISTEMA PROTEOLÍTICO MEDIADO POR PROTEOSSOMO DEPENDENTE DE UBIQUITINA E ATP NO <i>T.CRUZI</i> . .....                | 39        |
| 4.2 CONFECÇÃO DO MICROARRANJO .....   | 46        |
| 4.2.1 Amplificação das sondas e deposição na lâmina de vidro .....  | 46        |
| 4.2.2 Purificação do DNA .....  | 48        |
| 4.2.3 Produção do microarranjo.....   | 48        |
| 4.3 HIBRIDAÇÕES E ANÁLISES DOS DADOS OBTIDOS DO MICROARRANJO .....  | 50        |
| 4.3.1 Genes sem variações significativas nas duas metaciclogêneses .....  | 52        |
| 4.3.2 Genes com variação significativas nas duas metaciclogêneses .....   | 52        |
| 4.3.3 Genes que apresentaram variação significativa em somente uma metaciclogênese.....   | 57        |
| 4.3.4 Agrupamento dos genes da via proteossomo-ubiquitina em relação ao padrão de expressão observado nos experimentos de microarranjos. .... | 59        |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>72</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>73</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|           |  |
|-----------|--|
| ATP       | Adenosina trifosfato   |
| ATPase    | Enzima dependente de ATP                                     |
| BSA       | Albumina de soro bovino                                      |
| cDNA      | DNA complementar   |
| dATP      | Desoxiadenosina trifosfato                                   |
| dCTP      | Desoxicitosina trifosfato                                    |
| dGTP      | Desoxiguanina trifosfato                                     |
| dTTP      | Desoxitimina trifosfato                                      |
| dCTP-Cy 3 | Desoxicitosina trifosfato associado a cianina 3              |
| dCTP-Cy 5 | Desoxicitosina trifosfato associado a cianina 5              |
| DNA       | Ácido desoxiribonucleico                                     |
| DNase     | Desoxiribonuclease   |
| dNTPs     | Desoribonucleotídeos   |
| DO        | Densidade ótica  |
| DTT       | Ditiotreitol   |
| DUBs      | Enzimas desubiquitinadoras                                   |
| E1        | Enzima ativadora de ubiquitina                               |
| E2        | Enzima conjugadora de ubiquitina                             |
| E3        | Enzima ligadora de ubiquitina                                |
| EDTA      | Ácido etileno-diamino-tetracético                            |
| ESTs      | Etiquetas de seqüências expressas                            |
| g         | Aceleração da gravidade                                      |
| GP        | Glicoproteína  |
| HEPES     | (N-[2-hidroxietil] piperazino N' – [2-ácido etanosulfônico]) |
| kb        | 1.000 nucleotídeos   |
| kDa       | Quilo Dalton   |
| kDNA      | DNA do cinetoplasto  |
| LB        | Luria-Bertani  |
| LIT       | Infuso de fígado e triptose                                  |
| M         | Molar  |
| mRNA      | RNA mensageiro   |

|         |  |
|---------|--|
| PA      | Proteossomo ativador   |
| PAB     | Proteína ligadora de cauda poli A  |
| PARP    | Prociclinas  |
| PCR     | Reação em cadeia pela polimerase   |
| PEPCK   | Fosfo-enol piruvato carboxi quinase  |
| PPO     | 2,5 difeniloxazole   |
| RNA     | Ácido ribonucléico   |
| RNase   | Ribonuclease   |
| Rpn     | Partícula reguladora do proteossomo não dependente de ATP                        |
| Rpt     | Partícula reguladora do proteossomo dependente de ATP                            |
| RT      | Transcriptase reversa  |
| SDS     | Dodecil sulfato sódio  |
| SM      | Meio de suspensão para fagos   |
| TAU     | Urina artificial de triatomínio  |
| TAU3AAG | TAU suplementado com ácido L-aspartico, ácido L-glutâmico, L-prolina e D-glucose |
| Ub      | Ubiquitina   |
| UBA     | Domínios de associação à ubiquitina  |
| UBL     | Ubiquitina-like  |
| UBP     | Ubiquitinas específicas de processamento   |
| UCH     | Ubiquitinas carboxi-terminal hidrolase   |
| UTR     | Região não traduzida   |
| VSG     | Glicoproteína variante de superfície   |

Neste texto empregamos termos estrangeiros para definir, estruturas, processos moleculares, métodos, reagentes entre outros. Mantivemos nesses casos sua denominação original por não existir um glossário em português para estes termos.

## RESUMO

Os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação celular do *T. cruzi* das formas epimastigotas (não infectantes) para as formas tripomastigotas metacíclicas (infectantes), tem sido motivo de estudo de nosso grupo há muitos anos. Com o intuito de compreender os diversos mecanismos envolvidos neste processo, temos efetuado uma busca sistemática de genes diferencialmente expressos utilizando diferentes metodologias.

Em tripanosomas o controle do mecanismo da expressão gênica é feito em sua maioria a nível pós-transcricional ou pós-traducional (Elias, 2001). Consequentemente estes parasitas podem se adaptar rapidamente às transições entre o inseto vetor e o hospedeiro fazendo uma reprogramação na expressão de seus genes. Durante as mudanças adaptativas na morfologia, fisiologia e comportamento muitas proteínas são selecionadas e outras são degradadas. A regulação da diferenciação celular pode ser feita pela degradação ou não de proteínas específicas importantes.

A fim de investigar a existência da via proteolítica proteossomo-ubiquitina, bem como a expressão dos seus componentes utilizamos neste trabalho uma ferramenta da genômica funcional conhecida como microarranjo de DNA. O microarranjo utilizado possui uma cobertura de 45% para os genes dessa via proteolítica.

Os resultados das análises das hibridações com RNA polissomal e RNA total de epimastigotas, durante o início da metaciclogênese, sugerem que os genes da via sofrem uma regulação complexa de sua expressão.

Alguns componentes apresentam perfis comuns de expressão o que abre novas perspectivas para investigação de possíveis interações entre eles.

## ABSTRACT

The mechanisms involved in the cellular differentiation of *T. cruzi* epimastigote (non-infectious forms) into metacyclic trypomastigotes (infectious forms) have been studied by our group for many years. In order to understand the several mechanisms involved in this process a systematic search for differentially expressed genes was made using different technologies.

In trypanosomes, the gene expression control mechanism is mainly post-transcriptional or post-translational (Elias, 2001). Consequently, parasites can rapidly adapt to the vector-host transition by changes in its genes expression. Many proteins are selected and others are degraded during the adaptative morphology, physiology and behavioral changes. Cellular differentiation regulation may be done by specific proteins degradation.

In order to investigate the existence of the ubiquitina-proteasome pathway, in genomic fashion, DNA microarray technology was used. A microarray covering 45% for genes involved in this pathway was used.

Results of the polysomal RNA and total RNA hybridization analysis, during the start of metacyclogenesis, indicated complex gene expression regulation.

Some components in this pathway show a common pattern and opens new perspectives to investigation their putative interactions.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇA DE CHAGAS E O *TRYPANOSOMA CRUZI*

A doença de Chagas e o seu agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*, foram descritos em 1909 por Carlos Chagas (Chagas, 1909).

Este protozoário flagelado é um dos modelos parasitários mais estudados no mundo, não apenas em função da sua relevância em saúde pública, como também devido à sua posição na escala evolutiva, como um dos mais antigos organismos eucarióticos conhecidos.

A transmissão natural do *T. cruzi* para humanos está relacionada com um inseto vetor, conhecido como barbeiro que pertence à ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*. Essa família possui mais de cem espécies, entre as quais vários são vetores potenciais da Doença de Chagas. As espécies mais importantes relacionadas com a doença são *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Rassi e cols, 2000). A principal característica biológica dos triatomíneos é que todas as espécies são obrigatoriamente hematófagas e necessitam do repasto sanguíneo para completar seu desenvolvimento (Dias, 2000).

A transmissão pode ainda ser efetuada através da transfusão sanguínea e, com menor frequência, via transmissão congênita, acidente de laboratório (Brener, 1979) e transplante de órgãos (Dias, 1979; Schmunis, 2000). Também pode ocorrer a transmissão oral, através da ingestão de alimentos contaminados por *T. cruzi*, como por exemplo, carnes de caça cruas ou mal cozidas, contaminadas e mesmo outros alimentos, durante cujo preparo possa ter ocorrido à contaminação com material dos próprios vetores infectados (Chieef e Amato, 2000).

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida extremamente complexo, apresentando diversas variações morfológicas que se alternam entre dois tipos de hospedeiro: insetos e mamíferos, incluindo o homem (De Sousa, 1993). O ciclo de vida do *T. cruzi* pode ser classificado em silvestre, peridomiciliar e domiciliar, conforme os hábitos de seus hospedeiros (Forratini, 1980).

No ciclo silvestre, o *T. cruzi* circula entre vetores e reservatórios silvestres. Os insetos vetores formam suas colônias preferencialmente em palmeiras, cascas de árvores e ninhos de animais silvestres.

O ciclo doméstico depende de muitos fatores ecológicos e antropológicos, mas em grande parte ocorre devido ao deslocamento de colônias de insetos vetor de seus ambientes naturais para o ambiente doméstico, tais como fendas de construções de barro principalmente em áreas rurais.

O ciclo peridomiciliar ocorre devido à livre circulação, nas residências, de animais mamíferos domésticos como roedores, cães, gatos e marsupiais e também pela atração de triatomíneos silvestres às casas pela luz e alimento. Deste modo, há uma dinâmica interação entre os ciclos silvestre e doméstico.

No hospedeiro invertebrado, o ciclo biológico do *T. cruzi* inicia-se após a ingestão de sangue infectado durante o repasto sanguíneo. Ao chegar ao estômago do vetor, as formas tripomastigotas sanguíneas iniciam sua diferenciação em formas epimastigotas. Estas formas migram para o intestino onde se multiplicam. Nas porções médias e posterior do intestino, ocorre a diferenciação celular das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (formas infectivas), que são liberadas nas fezes e na urina do triatomíneo (Brenner, 1979; De Souza, 1984).

Durante o repasto sanguíneo de insetos infectados, parasitas podem ser eliminados nas fezes e podem infectar seus hospedeiros mamíferos através da pele (pequenas descontinuidades) ou pelas mucosas (Dias, 2000; Elias e cols, 2001).

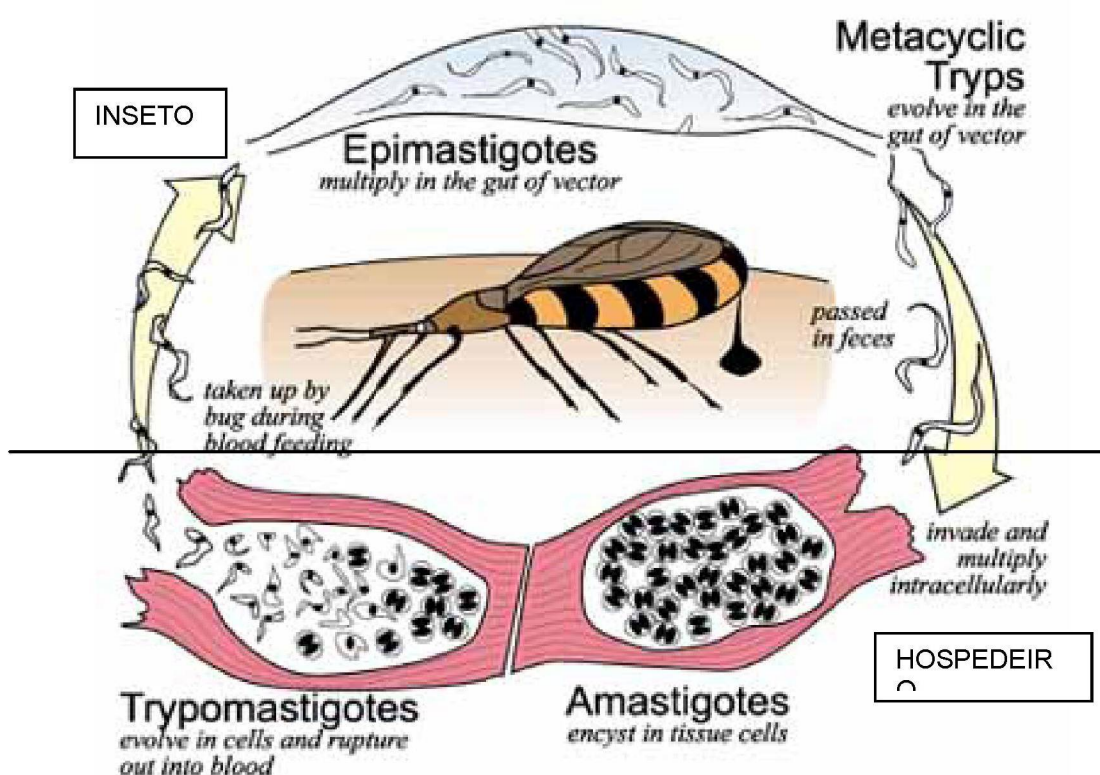
Os tripomastigotas podem se desenvolver na grande maioria das células com exceção de alguns tipos celulares, como neutrófilos e basófilos. A entrada do parasita na célula hospedeira é um processo complexo. O tripomastigota metacíclico entra na célula de uma maneira polarizada, preferencialmente ao longo da parte basolateral da membrana, onde fibronectinas e receptores da célula hospedeira estão concentrados (Schenkman, 1991).

Logo após a penetração, forma-se o vacúolo parasitóforo e se inicia a diferenciação das formas tripomastigotas metacíclicas em amastigotas, com posterior ruptura da membrana do vacúolo. Após sucessivas divisões dos amastigotas no interior da célula, ocorre um processo de transformação dos mesmos em tripomastigotas sanguíneos, passando por um estágio intermediário. Logo que as formas adquirem um flagelo mais longo, iniciam um movimento que pode ser o



responsável pela ruptura da membrana da célula hospedeira com a liberação de muitos tripomastigotas, algumas formas intermediárias e até formas amastigotas, para o espaço extracelular (De Souza, 1984).

Um grande número de tripomastigotas sanguíneos é liberado na ruptura da célula, estes parasitas podem ou não infectar outras células e tecidos, tais como sistema reticuloendotelial, sistema nervoso, músculo cardíaco, músculo esquelético ou serem ingeridos pelo inseto vetor, completando assim seu ciclo de vida (figura 1) (Brener, 1979; De Souza, 1984).



**Figura 1**

Ciclo evolutivo do *T. Cruzi*

Fonte: [www.uta.edu/chagas](http://www.uta.edu/chagas)

A célula rompida libera produtos que são ou ativam potenciais enzimas mediadoras da inflamação e que também podem funcionar como antígenos provocando respostas do sistema imunológico do hospedeiro (Brener, 1979).

A fase aguda da doença, quando sintomática, caracteriza-se por parasitemia elevada, febre, mal-estar, cefaléia, adenopatia, edema cutâneo, disfunção cardíaca, hepatomegalia e esplenomegalia. A letalidade dessa fase pode ser em decorrência de meningoencefalite e insuficiência cardíaca (Rassi e cols, 2000).

Os casos agudos não tratados podem evoluir para fase crônica, onde a maioria dos pacientes é assintomática (forma crônica indeterminada), e outros manifestam distúrbios cardíacos e digestivos, como megacólon (forma crônica determinada) (Dias, 2000). A doença crônica tem como importante manifestação a dilatação congestiva do coração que pode ocorrer anos após a infecção aguda (De Moraes, 1989).

Do ponto de vista epidemiológico, as formas crônicas determinadas são as que causam os maiores impactos médico-sociais, particularmente a cardiopatia crônica, com a conseqüente perda de produtividade, impedimento ao trabalho e comprometimento de órgãos vitais. Muitos casos de formas crônicas determinadas apresentam uma evolução benigna e muito lenta, compatível com muitos anos de vida. No entanto, muitos casos, principalmente nas cardiopatias chagásicas, acabam tendo uma evolução grave, com comprometimento cardíaco, sobrevivendo a morte por insuficiência cardíaca, arritmias graves e, também, por tromboembolismos (Puigbó e Cols, 1993; 1994; Guimarães e cols, 1997).

A doença de Chagas afeta milhões de pessoas na América Latina e ainda não existe profilaxia eficiente por vacinação ou tratamento quimioterápico efetivo.

O controle da diferenciação celular em *T. cruzi* sempre foi alvo de muita atenção por parte dos pesquisadores, uma vez que seu pleno entendimento poderia contribuir para o controle da doença e de sua transmissão. Nesse sentido, avanços significativos foram alcançados na tentativa de simular em laboratório as condições naturais que podem levar o parasita a mudar de forma, possibilitando o estudo da reprogramação gênica a que estes organismos são submetidos durante o processo de diferenciação, sobretudo para as formas infectivas. Além disso, a investigação das mudanças ocorridas durante a diferenciação podem promover importantes informações a respeito do complexo controle da expressão gênica destes parasitas.

## 1.2 METACICLOGÊNESE

A metaciclogênese corresponde ao processo de diferenciação celular das formas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* no interior do intestino do inseto vetor. A etapa do ciclo de vida do *T. cruzi* melhor caracterizada é a metaciclogênese, onde ocorrem várias mudanças morfológicas, metabólicas e genéticas tornando-o um processo apropriado para o estudo da diferenciação celular em eucariotos inferiores (Goldenberg, 1990). Este processo pode ser mimetizado *in vitro* em condições quimicamente definidas (Contreras e cols, 1985; Bonaldo e cols, 1988), resultando na obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas com propriedades biológicas semelhantes às descritas para o parasita que se diferencia no interior do inseto vetor (Contreras e cols, 1988).

A metaciclogênese *in vitro* ocorre após um estresse nutricional, que é gerado pela transferência dos epimastigotas cultivados em meio LIT, rico em termos nutricionais, para o meio TAU (urina artificial de triatomíneo), que consiste em uma solução ligeiramente hipertônica semelhante às condições iônicas encontradas na urina do inseto vetor. Após duas horas de incubação em meio TAU, os parasitas são transferidos para o meio de diferenciação (meio TAU3AAG) que consiste no meio TAU suplementado com glicose e três aminoácidos, L-prolina, ácido L-glutâmico, ácido L-aspartico, onde permanecem por 96 horas. Nestas condições cerca de 80% dos parasitas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (Contreras e cols, 1985; Bonaldo e cols, 1988).

Este tem sido o modelo adotado em nosso laboratório para os estudos dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica do parasita (Goldenberg, 1990).

A diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos requer a adesão dos epimastigotas a um substrato (Bonaldo e cols, 1988), semelhante ao que ocorre no interior do triatomíneo (Schaub, 1994; Garcis e cols, 1995). No início da metaciclogênese, especialmente durante o estresse nutricional e a adesão, deve ocorrer uma vasta reprogramação da expressão gênica (Goldenberg e cols, 1984). Desta forma, a caracterização e mapeamento dos genes expressos pelos parasitos (aderidos e não-aderidos) em diferentes etapas do processo de metaciclogênese podem prover dados fundamentais para o melhor entendimento deste complexo

processo. A compreensão das etapas da metaciclo-gênese também pode contribuir para a elucidação dos mecanismos que modulam a expressão de genes estágio-específicos.

### 1.3 CARACTERÍSTICA DO GENOMA DO *T. CRUZI*

A organização dos genes em tripanossomas e outros parasitas da ordem Kinetoplastida lembra o operon das bactérias, (Vanhamme e Pays, 1995; Teixeira, 1998; Clayton, 2002). Os genes que codificam proteínas são destituídos de introns estando geralmente reunidos em agrupamentos densos em tandem e suas seqüências são separadas por regiões intergênicas. Muitos genes estão presentes em duas ou mais cópias no genoma, que podem ser encontradas dispersas ou agrupadas. Como exemplos, temos os genes que codificam proteínas de choque térmico, histonas, cisteína-proteínases, ubiquitina, tubulinas, calmodulinas, amastinas, proteínas P  $\beta$  ribossomais, proteínas ligantes de cálcio, antígenos de superfície, entre outros. Igualmente organizados estão os genes para moléculas de RNA ribossomal e do mini-exon (Silveira, 2000; Hernandez e cols, 1990; Sogin e cols, 1986). A existência de genes multicópias nesses microrganismos poderia ser explicada como um mecanismo para evitar a perda de genes essenciais durante os vários ciclos celulares, permitindo assim a perpetuação da espécie. Outra hipótese estaria relacionada à manutenção dos níveis de produtos específicos na célula, como acontece com genes que codificam proteínas estruturais abundantes, por exemplo, histonas e tubulinas (Swindle e Tait, 1996).

Genes de cópia única ocorrem em freqüência relativamente pequena nos tripanosomatídeos, tais como os que codificam para DNA topoisomerase II (Fragoso e Goldenberg, 1992), TcPGP2 (Dallagiovanna e cols, 1996) e fosfatidil-inositol-fosfolipase C (Nozaki e cols, 1999).

O genoma do *T. cruzi* está situado em dois compartimentos bem definidos: núcleo e mitocôndria. Nos tripanosomatídeos, a mitocôndria apresenta características peculiares. Alberga uma complexa rede de moléculas circulares de DNA, localizada em uma região especializada, denominada cinetoplasto. Cada rede contém minicirculos de cerca de 1,4 kb e maxicirculos de cerca de 30 kb (Shapiro e Englund, 1995; Morris e cols, 2001).

Os maxicírculos assemelham-se em função ao DNA mitocondrial encontrado em outros organismos, ou seja, codificam para RNA ribossomal e um pequeno número de proteínas que estão envolvidas principalmente no metabolismo energético da mitocôndria (revisto por Shapiro e Englund, 1995).

Alguns RNAs transcritos pelos genes contidos nos maxicírculos sofrem uma modificação pós-transcricional que é denominada de edição do RNA. Este processo consiste na inserção e retirada de resíduos de uridina para a formação de uma fase aberta de leitura funcional. A especificidade do processo de edição é controlada por pequenas seqüências de RNA (RNAs guias) transcritas a partir dos minicírculos (Moffet e cols, 1997; Sloof e Benne, 1997).

A cromatina é similar, mas não idêntica, quando comparada com a de eucariotos superiores, pois as histonas de tripanosomatídeos possuem propriedades bioquímicas diferentes, interferindo na sua estrutura e na sua interação com DNA (revisto por Hecker, 1994; Belli, 2000).

O conteúdo de DNA do tripanosoma foi estimado através de diferentes metodologias: cinética de renaturação do DNA total, colorimetria e microfluorimetria (Castro e cols, 1981; Mc Daniel e cols, 1993). Os resultados obtidos com esses métodos mostraram que o conteúdo do DNA total (DNA + cinetoplasto) do *T. cruzi* varia intensamente entre as diferentes cepas, existindo inclusive variações entre clones derivados de uma mesma cepa (Dvorak e cols, 1982; Aymerich e Goldenberg, 1989; revisto por Henriksson e cols, 1996).

O polimorfismo cromossômico detectado entre as diferentes cepas pode ser o responsável por estas variações do conteúdo de DNA (Engman e cols, 1987).

Através de técnicas de eletroforese de campo pulsado (Schwartz e Cantor, 1984; Carle e cols, 1986) foi possível identificar bandas cromossômicas nestes parasitas. O genoma nuclear do *T. cruzi* consiste, em média, de 43 a 50 Mb de DNA distribuídos entre 30 a 40 bandas cromossômicas que apresentam tamanhos de 0,45 a 4,0 Mb (Johnston e cols, 1999).

Foi observada variação entre os cromossomos homólogos (Henriksson e cols, 1996) e a diferença de intensidade da fluorescência emitida pelas bandas cromossômicas após coloração com brometo de etídio sugere co-migração de dois ou mais cromossomos (Cano e cols, 1995). Apesar da plasticidade do genoma entre

cepas do *T. cruzi*, nenhuma modificação foi observada durante a transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (Aymerich e Goldeneberg, 1989).

O sequenciamento do genoma do *T. cruzi* ainda está em andamento. O projeto de sequenciamento deste genoma faz parte de um consórcio entre vários grupos. Na primeira fase, cerca de 20,000 seqüências foram determinadas pelo *Institute for Genomic Research* (TIGR), 14,000 pela *Upsala University* (UU) e outras 14,000 pelo *Seattle Biomedical Research Institute* (SBRI). A finalização do sequenciamento não apenas permitirá a descoberta de novos genes como também servirá como guia para construção de mapas de seqüências do *T. cruzi*. A segunda fase do projeto envolve o sequenciamento de cromossomos específicos (site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/> genome project).

#### 1.4 TRANSCRIÇÃO E O CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Os genes do *T. cruzi* estão muitas vezes organizados em tandem e são transcritos em longas unidades policistrônicas. Esta organização particular explica porque apenas poucos promotores têm sido encontrados. Genes originados da mesma unidade transcricional podem mostrar grandes diferenças no padrão de expressão. Isso leva à conclusão que, em tripanosomas, grande parte do controle da expressão gênica ocorre após a transcrição (Clayton, 2002).

As unidades de RNA policistrônicas são processadas através de reações de *trans-splicing* e poliadenilação para dar origem aos RNAs mensageiros maduros monocistrônicos. O *trans-splicing* é uma reação de processamento de RNA na qual seqüências de duas moléculas separadas são associadas para formar um mRNA maduro. Em tripanosomatídeos, uma seqüência, *spliced-leader* (SL) ou mini-exon, presente na extremidade 5' de um pequeno RNA não poliadenilado (SL-RNA), é adicionada ao transcrito primário em um sítio de clivagem caracterizado pelo dinucleotídeo AG e um resíduo de adenosina (Davis, 1996).

As reações de *trans-splicing* e poliadenilação ocorrem através de clivagens dentro das regiões intergênicas. Até o momento não há evidências para uma seqüência sinal consenso conhecida para a poliadenilação (Vanhamme e pays, 1995) e a reação parece ocorrer em uma região a montante situada a uma distância

conservada do sítio de corte e adição do mini-exon (Lebowitz e cols, 1993; Schurch e cols, 1994). As regiões intergênicas apresentam motivos ricos em pirimidinas que parecem ser cruciais para o processamento correto do mRNA (Huang e Vander Ploeg, 1991; Vassella e cols., 1994; Nozaki e Cross, 1995).

As três polimerases clássicas de eucariotos já foram identificadas em tripanosomatídeos (revisto por Vanhamme e Pays, 1995; Lee e Van der Ploeg, 1997).

Em eucariotos geralmente os genes que codificam proteínas possuem sua transcrição dirigida por promotores que são reconhecidos por RNA polimerase do tipo II, que são sensíveis à droga  $\alpha$ -amanitina.

Em eucariotos superiores, a regulação da expressão gênica, na maioria das vezes, é atribuída ao controle do início da transcrição pela RNA polimerase II. Em tripanosomatídeos nenhum promotor característico para essa enzima foi observado, com exceção para os genes do mini-exon onde algumas evidências sugerem que a transcrição dos genes de *Leishmania* que codificam a sequência líder é mediada por RNA pol II, enquanto outros snRNA são transcritos por RNA polimerase III (Saito e cols, 1994; Gillinger e Bellofatto, 2001; Matkin e cols., 2001).

Promotores para polimerase I foram identificados em *T. brucei* em genes que codificam glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) nas formas sanguíneas e da prociclina (Clayton e cols, 1990; Rudenko e cols, 1990; Zomerdijs e cols, 1990; Pays e cols, 1990).

Em tripanosomatídeos, de modo geral, a polimerase I transcreve os genes ribossomais e a polimerase III, moléculas de RNA nucleolar e de transferência. A polimerase II transcreve os genes do mini-exon (Gillinger e Bellofatto, 2001). Muitas evidências sugerem que os principais mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos ocorrem após o início da transcrição.

Estudos relacionados com a estabilidade de certos mRNAs propõem possíveis mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos. Esta estabilidade diferencial, de acordo com a forma evolutiva do parasita, pode estar em parte associada à presença de sequências reguladoras nas regiões não traduzidas. Estudos em *T. cruzi* demonstraram que a meia-vida do mRNA do gene amastina é sete vezes maior em amastigotas do que em epimastigotas e que uma região na 3' UTR é a responsável (Teixeira e cols, 1995). Este efeito é



provavelmente mediado por fatores que se ligam na região 3'UTR e estabilizam o RNA em amastigotas (Coughlin e cols, 2000).

Também foi demonstrado que, em *T. cruzi*, moléculas de RNA mensageiro, podem ser mantidas estáveis e não associadas aos polissomas, no citoplasma. (Goldenberg e cols, 1985). Existem evidências que o controle da mobilização polissomal é um importante mecanismo na regulação pós-transcricional. (Ávila e cols, 2001; Dallagiovanna e cols, 2001; Fragoso e cols, 2003). Este mecanismo provavelmente está também associado a seqüências nas UTRs o que leva à tradução diferencial dos RNAs. Em *Leishmania major* o gene da amastina tem a expressão regulada por um elemento em sua 3' UTR que modula a associação do transcrito deste gene a polissomos aumentando sua tradução (Boucher e cols., 2002). Outras evidências sobre um possível controle traducional também foram demonstradas em tripanosomatídeos. Em algumas proteínas expressas por *T. cruzi*, tais como, a cruzipaina (Tomás e Kelly, 1996), topoisomerase II (Fragoso e cols, 1998) e KMP 11, umas proteínas de 11 kDa associadas ao citoesqueleto do parasita (Thomas e cols, 2000), foram observadas que, apesar de níveis similares de mRNA estarem presentes em todas as formas evolutivas do parasita, os níveis de proteínas eram maiores nas formas epimastigotas em relação às outras formas.

## 1.5 A GENÔMICA FUNCIONAL E A TECNOLOGIA DO MICROARRANJO

Muitos avanços ocorreram nos últimos anos na tentativa de clonar, sequenciar e mapear o genoma de vários organismos. No entanto, pouco se sabe ainda a respeito da função biológica, expressão e regulação destes genes seqüenciados (Panda, 2003).

O genoma de um organismo é uma entidade física dinâmica, compreende o DNA genômico ligado a diferentes proteínas e está organizado em cromossomos. O DNA genômico pode ser modificado por processos específicos como metilação, assim como a estrutura cromatínica pode sofrer fosforilação e ubiquitinação sendo que estas modificações podem definir o funcionamento do genoma (Carpenter e Sabatini, 2004).

Muitas questões ainda estão sem resposta a respeito do complexo funcionamento e comportamento do genoma. Para ampliar o conhecimento destes



aspectos surge então a genômica funcional, voltada para o estudo da função biológica das seqüências de DNA, do papel de cada gene e da interação entre grupos de genes no genoma.

As ferramentas de genômica funcional permitem diversas formas de abordagem que promovem respostas para algumas questões básicas que incluem, quando o gene é expresso, onde o produto está localizado, quais as interações que o gene faz e que fenótipo resulta quando ele é mutado. A genômica funcional aspira responder sistematicamente questões para todos os genes no genoma, ao contrário das abordagens convencionais que estudam um gene por vez (Steinmetz, 2004).

Novos recursos tecnológicos vêm sendo desenvolvidos para implementar essa nova etapa pós-genômica ou da genômica funcional. Entre estes recursos estão aqueles que permitem a análise em grande escala de transcritos como o método *differential display* (Liang e Pardee, 1992), *representation of differential expression* (Krieger e Goldenberg, 1998), bibliotecas normalizadas de cDNA, microarranjo de DNA (Schena e cols, 1990) e de seus produtos, tais como, eletroforese bidimensional e espectrometria de massa MALD - TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) (Pandley e Mann, 2000).

Estes recursos procuram fazer a correlação dos genomas à sua função biológica pelo estudo das moléculas, transcritos ou proteínas, que estes genomas estão expressando (Mir, 2000; Vidal, 2001).

A tecnologia de microarranjo é um dos recursos usados para aumentar a probabilidade de caracterização de funções biológicas, sendo uma poderosa ferramenta pela qual é possível obter informações sobre a expressão de muitos genes simultaneamente avaliados em diferentes condições biológicas (Yee Hwa Yang e Terry, 2002).

Os Microarranjos de DNA consistem em um conjunto de sondas de ácidos nucléicos imobilizadas em uma superfície sólida, geralmente vidro ou uma membrana de náilon ou nitrocelulose. As dimensões das áreas cobertas pelas sondas individuais, denominadas de spot, são microscópicas e organizadas de forma ordenada, justificando, portanto, o nome de microarranjos. Dois tipos microarranjos são mais comumente usados, No primeiro tipo de microarranjo, oligonucleotídeos são sintetizados diretamente na superfície da lâmina de vidro. Fotolitografia e fotosensibilidade são os métodos químicos geralmente usados para

síntese e chegam a uma densidade maior que 1.000,000 *spots/cm*<sup>2</sup>. No segundo tipo de plataforma de microarranjo, as moléculas são sintetizadas separadamente e carimbadas na lâmina de vidro chegando a uma densidade de ~10.000 *spots/cm*<sup>2</sup>. (revisto por Steinmetz, 2004).

Os genes ou produtos de genes sintetizados separadamente podem ser obtidos por amplificação em cadeia pela enzima *Taq* DNA polimerase e são então purificados e depositados, com auxílio de um equipamento com controle computadorizado, na superfície da lâmina de vidro formando um *spot*. O tamanho dos *spots* é geralmente de 50-350 µm, podendo variar de um sistema para outro (Sourthen e cols, 1999).

As lâminas de vidro usadas nos microarranjos apresentam baixa fluorescência intrínseca e sofrem um tratamento especial com poli-lisina ou amino-silano, os quais aumentam sua hidrofobicidade e aderência do DNA depositado (Shena, 2002).

As amostras que serão analisadas no microarranjo podem provir de diferentes fontes biológicas. Essas amostras são convertidas para uma população de ácidos nucléicos marcados com fluoróforos. Populações distintas que serão comparadas no microarranjo são marcadas com fluoróforos diferentes (Duggan e cols, 1999).

As amostras marcadas com fluoróforos são colocadas em contato com a lâmina carimbada com os ácidos nucléicos sob condições definidas para que se dê a hibridação pela complementaridade das fitas simples, formando fitas duplas. O número de fitas duplas formadas reflete o número relativo de cada amostra específica marcada. Através da medição dos sinais emitidos pelos fluoróforos de cada *spot* hibridado, a relativa abundância das específicas seqüências de cada amostra pode ser determinada (Cheung e cols, 1999).

A leitura do sinal é feita por um *scanner* óptico constituído por *lasers* que emitem diferentes comprimentos de onda, apropriados para excitar os fluoróforos que então emitem fluorescência detectada pelo aparelho. A análise das imagens obtidas desses sinais é feita por *softwares* especializados que primeiramente extraem os dados das lâminas lidas pelo *scanner*.

As análises de microarranjos vêm sendo aplicadas principalmente na área de análise de expressão gênica, análises comparativas do genoma e descoberta de novas drogas. A análise da expressão gênica examina a composição de RNA mensageiro de populações de células dando informações sobre o estado celular e

atividade de seus genes, bem como informações sobre suas proteínas (Brown e Botstein, 1999). A análise da expressão gênica através de microarranjos tem sido aplicada para estudar vários organismos como mamíferos, plantas, leveduras, bactérias. Alguns estudos examinam o efeito de diferentes tratamentos das células e a consequência deste nos níveis de expressão de RNA, caracterização de doenças, estudo de vias metabólicas importantes e mecanismos de ação da célula (Lander, 1999; Ingen, 2000).

A tecnologia de microarranjo de DNA também vem sendo aplicada em estudos com parasitas Kinetoplastída a fim de descobrir novos genes que possam contribuir para criação de vacinas ou servir como alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas drogas. Estudos com microarranjos de DNA de *Leishmania major* identificaram novos genes que são expressos de uma maneira estágio - específica. Em *T. brucei*, foram identificados novos genes os quais possuem diferentes níveis de expressão nos diferentes estágios do parasita (revisto por Duncan e cols, 2004).

Análises de microarranjo de DNA em estudos com *T. cruzi*, revelaram mudanças na expressão gênica durante a transformação de tripomastigotas em amastigotas sendo que 38 genes se apresentaram mais expressos em amastigotas (Minning e cols, 2003). Microarranjo de DNA foi usado também em estudos comparativos entre cepas diferentes de *T. cruzi*. Nestes estudos foram identificados genes diferencialmente expressos entre as populações analisadas fornecendo evidências para um alto nível de regulação pós transcricional (Baptista e cols, 2004).

O microarranjo pode também auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de diferenciação celular do *T. cruzi* das formas epimastigotas (não infectantes) para as formas tripomastigotas metacíclicas (infectantes).

A utilização do microarranjo deste trabalho teve por objetivo investigar a via proteolítica mediada pelo proteossomo e dependente de ubiquitina e ATP, quanto a expressão de seus genes durante a metaciclogênese buscando analisar o comportamento dos componentes da via nos diferentes estágios evolutivos do parasita.

## 1.6 VIA PROTEOLÍTICA MEDIADA PELO PROTEOSSOMO DEPENDENTE DE ATP E UBIQUITINA

A degradação seletiva de proteínas é uma atividade essencial para a vida dos organismos e, em eucariotos, envolve uma complexa maquinaria proteolítica celular chamada proteossomo (26S), cuja função é dependente de ATP e ubiquitina.

O proteossomo é uma estrutura dinâmica formada de maneira modular e apresenta um papel importante na via de degradação de proteínas tanto no citosol, quanto no núcleo de células eucarióticas. Nesta via proteolítica os substratos são primeiramente marcados por ligações covalentes a múltiplas moléculas de ubiquitinas para, então, serem degradados no proteossomo (Paugam e cols, 2003).

A ubiquitina (Ub) é uma proteína globular de 76 aminoácidos altamente conservada entre os eucariotos, sendo encontrada como um monômero e também conjugada a outras proteínas, por uma ligação covalente entre seu C-terminal e uma lisina da proteína que será marcada (Witby e cols, 1998).

A estrutura do proteossomo (26S) foi descrita como sendo formada por um núcleo catalítico (20S), em forma de barril, e por um complexo regulatório (19S) formado por uma espécie de tampa e uma base. Os componentes 26S, 20S e 19S são assim denominados devido aos seus coeficientes de sedimentação.

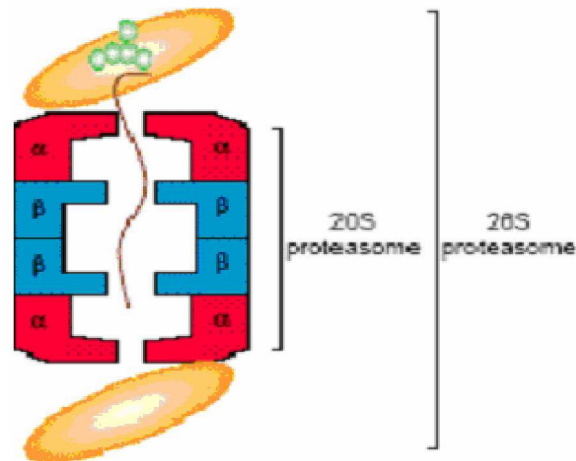
A tampa consiste de oito subunidades não-ATPase (Rpn 3, Rpn 5-9, Rpn 11 e Rpn 12) e a base consiste de seis subunidades ATPase (Rpt 1-6) e 2 subunidades não-ATPase (Rpn1 e Rpn2). A subunidade Rpn 10 parece existir na interface dos subcomplexos tampa e base (Saeki e cols, 2002).

O complexo 19S, também chamado de proteossomo ativador (PA) 700, confere especificidade e regulação dos substratos (Paugam e cols, 2003).

O núcleo catalítico 20S é formado por 28 subunidades as quais têm massa molecular que variam de 20 a 35 KDa e pontos isoelétricos que variam de 4,5 a 8,7. Sob o microscópio eletrônico, estas subunidades aparecem arranjadas como um cilindro composto de quatro pilhas de anéis, cada uma contendo sete subunidades. As duas pilhas externas são formadas pelas subunidades alfas que controlam a passagem de substratos e a degradação fora ou dentro do proteossomo. As duas pilhas internas de anéis, chamadas subunidades betas, possuem funções catalíticas



(revisto por Weissman, 2001). Na figura 3 está esquematicamente representado o proteossomo 26S.



**Figura 2**

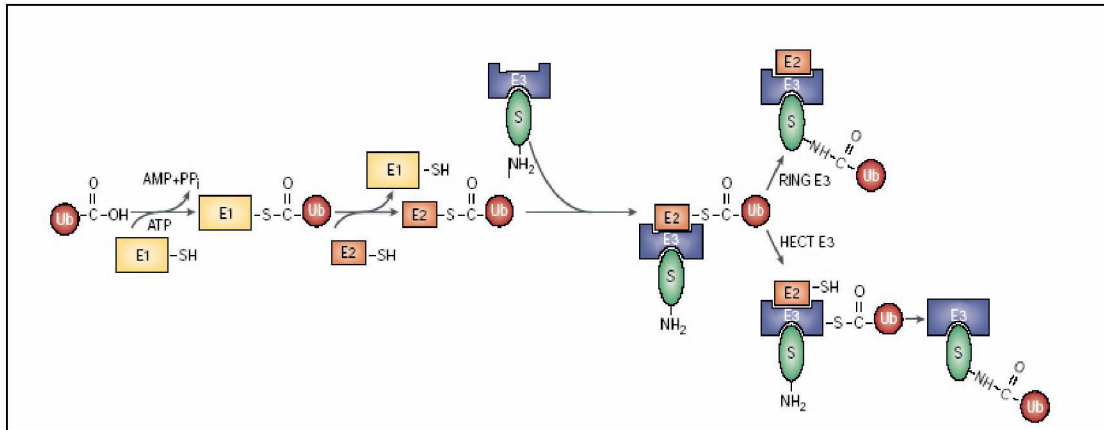
Proteossomo 26S e suas subunidades 19S em amarelo e 20S em vermelho e azul .

Fonte: TRENDS in parasitology 2002

Dentre as principais funções dos proteossomos estão: (1) proteólise de proteínas alteradas, truncadas ou inadequadamente dobradas; (2) controle do ciclo celular por degradação seletiva de proteínas regulatórias, tais como de fatores de transcrição e ciclinas. Proteossomos e ubiquitinas estão envolvidos em várias funções biológicas como diferenciação celular, resposta a estresse, adaptação metabólica, resposta imune celular, biogênese de organelas, apoptose, transporte de proteínas, inflamação, processos antigênicos e reparo de DNA (revisto por Pickart e Cohen, 2004).

Nos eucariotos, a proteólise dependente de ubiquitina ocorre em diversos passos. Inicialmente as ubiquitinas são ativadas pelas E1, enzimas ativadoras de ubiquitina, as quais atuam formando uma ligação com o C-terminal da glicina da ubiquitina num processo ATP dependente. As enzimas do tipo E2, enzimas conjugadoras de ubiquitina, carregam transitoriamente a ubiquitina ativada. A E3, ubiquitina ligase, liga-se diretamente à E2 e transfere a ubiquitina ativada da E2 para o substrato, promovendo a formação de uma ligação peptídica entre uma lisina no substrato e um C-terminal da ubiquitina. A E3 liga as cadeias de poliubiquitinas ao substrato sendo responsável pela especificidade dos substratos que serão marcados

para degradação (Hershko e Ciechanover, 1998). Na figura 2 está representado de forma esquemático este processo.



**Figura 3**

Via de Ubiquitinação

Fonte: Nature reviews | molecular cell biology, volume 2, março 2001.

Foram identificadas famílias distintas de E3 que contêm domínios conservados. O domínio E3 HETC (homology to E6 C-terminus) faz uma ligação covalente intermediária com a ubiquitina como parte do processo que direciona a ubiquitina da E2 para o substrato. O domínio E3 *Ring Finger* parece mediar a transferência direta da ubiquitina da E2 para o substrato (Soares e cols, 2003).

Após a adição da primeira ubiquitina ao substrato, diversas outras ubiquitinas podem ser adicionadas apenas pela repetição das mesmas reações bioquímicas, mas com a modificação de que a ligação peptídica é, agora, formada entre a glicina 76 da ubiquitina ativada e o grupo  $\Sigma$  (carbono  $\Sigma$  do aminoácido) de uma das três lisinas (K29, K48 e K63) da ubiquitina já ligada. Geralmente, substratos com uma cadeia de poliubiquitina ligada através de K48 são destinados para degradação no proteossomo 26S, já os substratos ligados a ubiquitinas pela K63 e K29 têm sido relacionados a processos não degradativos com transporte e ativação transcricional (Pickart, 2001).

O substrato ligado à cadeia de poliubiquitina é reconhecido por subunidades da base do subcomplexo 26S e possivelmente também por outras subunidades 19S. É proposto que uma ou mais subunidades ATPase na base do subcomplexo 19S encontrem um sítio de engate no substrato polipeptídico, o qual é usado como um

ponto de partida de deslocamento do substrato através de um possível poro na base do subcomplexo. O deslocamento do substrato através do poro é dirigido por hidrólise de ATP e por desnaturação do substrato. O substrato transita pelo cilindro central 20S onde sofre hidrólises e produz pequenos peptídeos que saem do cilindro por um poro axial que pode ser aberto por um segundo subcomplexo regulador. Também participam deste processo as enzimas desubiquitinadoras (DUB) que removem as cadeias de poliubiquitinas dos substratos (revisto por Pickart e Cohen, 2004).

As DUBs pertencem à família das cisteínas proteinases e podem ser divididas em ubiquitinas carboxi-terminal hidrolases (UCH) e ubiquitinas específicas de processamento (UBP). Uma função importante das DUBs é prevenir o acúmulo de cadeias de poliubiquitinas no proteossomo. Falhas na remoção dessas cadeias prejudicariam o movimento normal das proteínas ubiquitinadas através do proteossomo. Outra função seria de clivar as cadeias de poliubiquitinas em monoubiquitinas, para que reiniciem o processo de marcação de proteínas (revisto por Weissman, 2001).

A partícula regulatória não-ATPse 11 (Rpn 11) da tampa do subcomplexo 19S parece também hidrolisar a ligação peptídica que liga a cadeia de poliubiquitina ao substrato. Estudos com mutações em leveduras nessa subunidade levaram ao acúmulo de cadeias de poliubiquitina e morte celular (revisto por Pickart e Cohen, 2004).

Um grupo de proteínas semelhante as ubiquitinas quanto à sequência de aminoácido vem sendo identificado. As ubiquitinas-like têm em sua forma ativa uma glicina na região carbóxi-terminal e podem atuar como flexíveis módulos adaptadores que alteram a conformação ou as interações das proteínas. Algumas ubiquitinas-like participam de uma via metabólica paralela à via da ubiquitina com distintas E1-likes e E2. Cada via da ubiquitina-like possui distintas funções celulares. A ubiquitina-like SUMO tem chamado muito atenção nos últimos anos. O processo de conjugação de SUMO é altamente regulado em todos os eucariotos e participa de diversos eventos tais como transporte nuclear, regulação da transcrição, segregação de cromossomos e controle do ciclo celular. (Schwartz, 2003).

Apesar da intensa investigação dessa via proteolítica mediada pelo proteossomo, ainda não está bem claro como ocorre o processo de degradação e como as proteínas poliubiquitinadas são recrutadas.

Nos parasitas protozoários, o proteossomo está envolvido na diferenciação celular e replicação, sendo considerado um interessante alvo terapêutico. Entretanto, a caracterização e identificação molecular das subunidades do proteossomo de parasitas protozoários ainda estão incompletas.

A recente identificação de inibidores de proteossomo tem ajudado a definir seu papel em vários processos, no entanto, os inibidores não são totalmente específicos, pois podem inibir outras proteases.

A presença do proteossomo em *T. brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania* e *Plasmodium falciparum* já foi descrita. A presença de genes de ubiquitina em tripanosomatídeos indica a existência de uma via de degradação proteolítica mediada por ubiquitina, entretanto, o recrutamento e o papel dos componentes do sistema ainda são desconhecidos (De Diego e cols, 2001).

O proteossomo dos tripanossomas é o mais estudado nos protozoário. O proteossomo de *Trypanosoma brucei* foi o primeiro a ser purificado e caracterizado (Mutumba e cols, 1997).

O proteossomo 26S de *T. brucei* foi identificado como possuindo um complexo estável 20S com sete subunidades alfas e sete betas e um 19S também estável. Apenas 2 subunidades são cataliticamente ativas ( $\beta_2$  e  $\beta_5$ ) (Li Ziyin, 2002).

A atividade do proteossomo em *T. brucei* parece ser essencial para a progressão do ciclo celular através do controle celular diferencial em formas sanguíneas e formas procíclicas (Motumba, 1998). Esse dado é consistente com o envolvimento do proteossomo na regulação da concentração celular de ciclinas em tripanosamatídeos (Van Hellemond e cols, 2002).

Algumas diferenças foram encontradas entre o proteossomo de protozoários e de mamíferos. O proteossomo de *T. brucei* difere do proteossomo de mamíferos nos seguintes aspectos: (1) o proteossomo 20S tem massa molecular de 630 KDa comparado com 700 KDa em mamíferos, (2) em gel de eletroforese bidimensional o proteossomo 20S do tripanossoma produziu apenas 26 pontos de proteínas – muito menos do que encontrado em proteossomo 20S de células de fígado de rato (71), (3) embora a morfologia e as dimensões do proteossomo de *T. brucei* sejam



próximas do proteossomo dos mamíferos, o diâmetro do poro do 20S em *T. brucei* é maior do que em 20S de rato, (4) anticorpos policlonais contra o 20S proteossomo humano não apresentaram reações cruzada apreciáveis com o 20S proteossomo de *T. brucei* (formas procíclicas e sanguíneas), mas apresentaram forte reação cruzada com proteossomo 20S de rato (Yao e cols, 1999). Apesar dessas diferenças encontradas, os componentes do proteossomo dos protozoários são similares ao de outros eucariotos quando a estrutura e atividade enzimática.

O proteossomo 26S do *T. cruzi* foi identificado como um complexo de 1400 kDa, com cerca de 30 proteínas, entre 25 e 110 KDa ( De Diego e cols, 2001).

A participação de ubiquitina do processo de degradação de proteínas em *T. cruzi* é sugerida pelo grande aumento no nível de proteínas ubiquitinadas quando tripomastigotas se diferenciam em amastigotas. A análise das proteínas do citoesqueleto de *T. cruzi* durante a transformação de tripomastigotas em amastigotas, quando o parasita sofre drásticas mudanças na sua forma, demonstraram um aumento na conjugação de ubiquitinas nas proteínas flagelares. Também se observou um acúmulo de proteínas ubiquitinadas na presença de um inibidor de proteossomo específico chamado lactacistin (De Diego e cols, 2001).

Estudos revelaram que o proteossomo é necessário para a remodelação do *T. cruzi*, mas os substratos que são degradados ainda não foram identificados. Os substratos provavelmente incluem além de proteínas que mantêm a forma, como as proteínas do citoesqueleto, um grupo de proteínas e enzimas envolvidas nas vias metabólicas e proteínas de superfície estágio-específicas. A degradação de proteínas regulatórias específicas pelo proteossomo pode resultar na ativação de um mecanismo envolvido com mudanças estágio-específicas (Gonzáles e cols, 1994).

Na presença do lactacistin ocorre o bloqueio da diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, mas não apresenta efeito em tripomastigotas intracelulares de cultura de mioblasto o que sugere que a atividade do proteossomo não é requerida para a invasão celular (Bartholomeu e cols, 2001).

A subunidade regulatória não-ATPase (Rpn-1) foi clonada e caracterizada em *T. cruzi*. Essa subunidade pode estar relacionada com a regulação e recrutamento de proteínas para a degradação, contudo análises ainda são necessárias para o entendimento de sua função (Zou Chun-Bin e cols, 2000).

A existência da via de degradação de proteínas dependente de ubiquitina-proteossomo em protozoários foi recentemente sugerida em estudos com *T. cruzi* com inibidores de proteossomo, mas ainda restam por esclarecer muitos aspectos relacionados aos componentes envolvidos nesse processo, suas funções e como interagem.

A caracterização da expressão dos genes da via proteolítica ubiquitina-proteossomo, durante a metaciclogênese, representa o primeiro passo para a investigação do papel desta via neste processo, pois ela pode estar atuando de maneira específica sendo responsável pelo disparo ou pelas mudanças ocorridas no parasita ao longo da metacilcogênese.

A utilização do microarranjo nessa pesquisa com *T. cruzi* visa identificar mudanças na expressão gênica durante sua evolução, investigando e comparando as mudanças dos genes desta via proteolítica, pois durante a metaciclogênese ocorrem muitas alterações metabólicas e morfológicas que resultam da ação integrada de produtos e genes que estão sendo expressos.

Os dados obtidos das análises podem fornecer informações a respeito da participação destes genes na via proteolítica, bem como gerar um agrupamento de genes hierarquizados por um perfil de expressões comuns o que abrirá novas perspectivas de investigação.

## 2. OBJETIVOS

- Realizar uma busca sistemática dos componentes que participam da via de degradação de proteínas mediada pelo proteossomo dependente de ubiquitina e ATP, nos bancos de dados que contém o genoma de *T. cruzi*, visando avaliar se a via está presente em *T. cruzi*, qual seu potencial e que diferenças apresentam em relação a outros eucariotos.

- Avaliar a expressão dos genes da via de degradação de proteínas mediada pelo proteossomo dependente de ubiquitina presentes no microarranjo, produzido por nossa equipe, ao longo da metaciclogênese.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E PROCEDÊNCIA:

##### 3.1.1 Amersham-Parmacia Biotech

- dCTP-Cy3
- dCTP-Cy5
- RNase H
- Taq DNA polimerase

##### 3.1.2 Applied Biosystems

- *Optical - 96 well reaction plate*

##### 3.1.3 Bio Rad

- Acrilamida
- Agarose
- Azul de bromofenol
- Persulfato de amônia

##### 3.1.4 Invitrogen

- *Bio primer DNA labiling system*
- DTT
- EDTA
- Fenol
- Klenow- fragmento da DNA polimerase I
- *RNA ladder*
- RNase out-inibidor de RNase
- Sacarose
- SuperScript™ II- enzima transcriptase reversa

##### 3.1.5 Life technologies

- *Concert rapid PCR purification system*

### 3.1.6 MERCK

- Acetato de sódio
- Ácido acético
- Ácido clorídrico
- Ácido bórico
- Álcool isoamílico
- Azida sódica
- Citrato de sódio
- Cloreto de sódio
- Clorofórmio
- Etanol absoluto
- Hidróxido de sódio
- SDS
- SSC

### 3.1.7 Millipore

- Colunas Microcon 30 – *microcon*<sup>®</sup> Amicon Bioseparations
- Placas Mult Screen<sup>®</sup>- PCR

### 3.1.8 New England Biolabs

- Enzimas de restrição
- Tampões para as enzimas de restrição

### 3.1.9 Promega

- Affigel-blue – colunas de purificação
- RNAsin<sup>®</sup>- inibidor de RNase
- ImpromII<sup>™</sup>- enzima transcriptase reversa

### 3.1.10 Qiagen

- QIA *filter plasmid mini kit*
- QIA *filter plasmid mid kit*
- QIA *quick 96 PCR purification kit*
- RNAeasy kit

### 3.1.11 Roche Molecular Biochemicals

- *High pure PCR product purification kit*

### 3.1.12 Sigma

- Ampicilina
- $\beta$ -mercaptoetanol
- brometo de etídio
- BSA
- Cicloheximida
- DEAC-celulose
- DMSO
- DNA de esperma de salmão
- Ficol
- Formamida
- Heparina
- Hepes
- L-prolina
- NP-40
- Tetraciclina
- Glicerol

### 3.1.13 Whatman

- Papel 3MM chr
- Membrana de nitrocelulose

## 3.2 MEIOS DE CULTURA

### 3.2.1 Meio LB

Bacto-triptona 10 g/l

Extrato de levedura 5 g/l

NaCl 5 g/l

### 3.2.2 Meio LB ágar

Meio LB suplementado com 15 g/l de ágar

**3.2.3 Meio LIT (liver infusion tryptose)**

Extrato de levedura 15 g/l  
Fosfato dibásico de sódio 11,56 g/l  
Glucose 2,2 g/l  
Hemina 0,02 g/l  
Infuso de fígado 5 g/l  
KCl 0,4 g/l  
NaCl 4,4 g/l  
Soro fetal bovino 10%  
Tryptose 5 g/l pH 7,2

**3.2.4 Meio TAU (triatomine artificial urine)**

CaCl<sub>2</sub> 2 mM  
KCl 17 mM  
MgCl<sub>2</sub> 2 mM  
NaCl 190 mM  
Tampão fosfato pH 6,0 8 mM

**3.2.5 Meio TAU 3AAG**

TAU suplementado com:  
Ácido L-aspártico 2 mM  
Ácido L-glutâmico 50 mM  
Glicose 10 mM  
L-prolina 10 mM

**3.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES****3.3.1 Colchão de sacarose**

Sacarose 2 M em tampão hipotônico de lise celular

**3.3.2 Clorofórmio/álcool isoamílico**

24 partes de clorofórmio  
1 parte de álcool isoamílico

**3.3.3 Fenol clorofórmio**

25 partes de feno saturado

24 partes de clorofórmio

1 parte de ácool isoamílico

**3.3.4 Solução para hibridação no microarranjo de DNA**

Denhart's 5X

DNA esperma de salmão 0,25 mg/ml

Formamida 50%

SDS 0,1%

SSC 6X

**3.3.5 Solução para lavagem do microarranjo de DNA**

Média extringência: 0,5 X SSC; 0,01 % SDS

*Pós-wash*: 0,06X SSC

**3.3.6 Solução para ressuspensão dos polissomas**

EDTA 10 mM

NaCl 100 mM

SDS 0,5 %

Tris HCL pH 7,0 10 mM

**3.3.7 Tampão de lise**

- β-mercaptoetanol 8%

EDTA 10 mM

Isocianeto de guanidina 5M

Tris HCl pH 7,7 50 mM

**3.3.8 Tampão hipotônico de lise**

β-mercaptoetanol 5 mM

cicloheximida 10 µg/ml

heparina 20 U/ml

MgCl<sub>2</sub> 5 mM

NaCl 10 mM

Tris HCl pH 7,5 10 mM



### 3.3.9 Tampão MOPS

Acetato de sódio

EDTA pH 7,5 2 mM

MOPS 20 mM

### 3.3.10 Tampão PBS

### 3.3.11 Tampão TBE (10X)

Ácido bórico 55g/l

EDTA 8,3 g/l

Trisma base 108g/l

### 3.3.12 Tampão TE

EDTA 1 mM

Tris-HCl pH 7,6 10 mM

## 3.4 MICROORGANISMO

### 3.4.1 *Escherichia coli*

Linhagem Y 1090

### 3.4.2 *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho foi utilizado o clone Dm28c (*Didelphis marsupialis*) de *T. cruzi*, em diferentes fases de diferenciação durante a metaciclogênese *in vitro*.

- Formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento

As formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram obtidas de cultura axênica de *T. cruzi*, em meio LIT a 28°C, no terceiro dia de cultivo quando a densidade celular é de ~2 a 3 x10<sup>7</sup> células/ml.

- Formas epimastigotas estressadas

As formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento, no quinto dia de cultivo, quando a densidade celular é de 7 x 10<sup>7</sup> células /ml, foram submetidas a condições estressantes, quando transferidas para o meio TAU por 2 horas.

- Formas epimastigotas aderidas por 3 horas

Após o estresse nutricional, as células foram cultivadas por 3 horas em meio TAU3AAG a 28°C. Durante este período, os parasitas aderiram-se às paredes das garrafas de cultivo. Foram acrescentados à garrafa 10 ml de tampão NKM, após o sobrenadante ter sido desprezado, e então, sob forte agitação os epimastigotas aderidos foram liberados.

- Formas epimastigotas há 12 horas

Após o estresse nutricional, as células foram cultivadas por 12 horas em meio TAU3AAG a 28°C. O resto do procedimento para obtenção dos parasitas foi igual ao descrito anteriormente para aderidos há 3 horas.

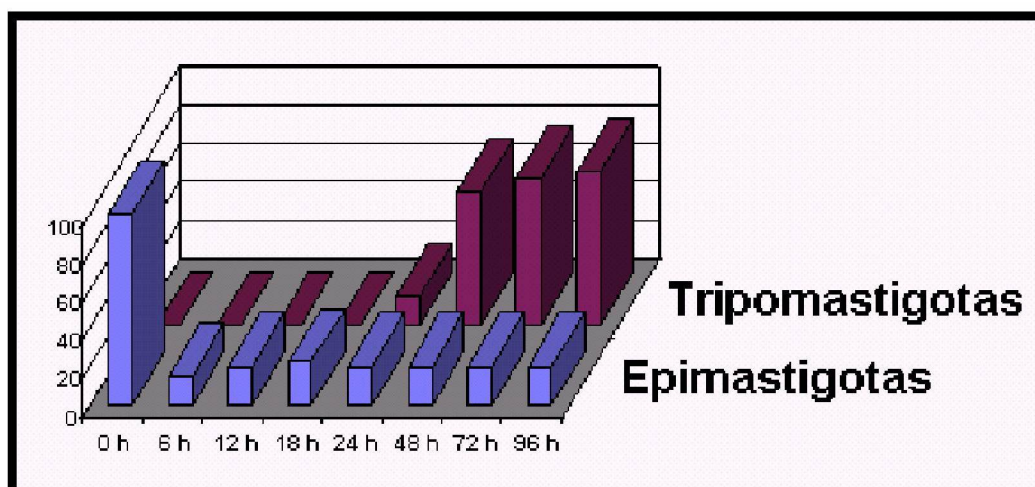
- Formas epimastigotas aderidos há 24 horas

Após o estresse nutricional, as células foram cultivadas por 24 horas em meio TAU3AAG a 28°C. O resto do procedimento para obtenção dos parasitas foi igual ao descrito anteriormente para aderidos há 3 horas.

Durante o processo de metaciclogênese *in vitro* todas as formas podem ser separadas, em diferentes tempos, tanto no sobrenadante do meio de cultura como as formas que ficam aderidas à parede da garrafa.

A obtenção de tripomastigotas metacíclicos está esquematizada na figura 3, onde estão representadas as porcentagens das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos nos diferentes períodos durante a metaciclogênese *in vitro*.

**Figura 04.** Porcentagem de formas epimastigotas e tripomastigotas presentes no sobrenadante de cultura em meio TAU3AAG, em diferentes períodos de tempo



Fonte: Bonaldo e col, 1988, modificado.

Legenda:

- As colunas vermelhas representam a quantidade em porcentagem (eixo y) de tripomastigotas ao longo das horas (eixo x).
- As colunas azuis representam a quantidade em porcentagem (eixo y) de epimastigotas ao longo das horas (eixo x).

### 3.4.3 Biblioteca de cDNA

Construída em vetor pGEM T-easy, contém insertos de ~0,5 kb. As moléculas de cDNA foram obtidas a partir de amostras de RNA de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, epimastigotas estressados, epimastigotas aderidos e tripomastigotas metacíclicos do clone Dmc 28 de *T. cruzi*.

### 3.5 ISOLAMENTO DAS FRAÇÕES DE RNA

Devido às peculiaridades do processo de regulação da expressão gênica dos tripanosomatídeos, centramos nossas análises em duas diferentes frações de RNA. Desta forma, utilizamos uma fração denominada RNA total, onde estas moléculas foram extraídas utilizando técnicas convencionais. Alternativamente, utilizamos

procedimentos de isolamento de RNA associado a polirribossomos, sendo esta fração denominada RNA polissomal.

### **3.5.1 Isolamento de RNA total**

Para a obtenção de RNA total, cerca de  $5,0 \times 10^{10}$  células (epimastigotas, epimastigotas estressados, epimastigotas aderidos há 3 horas, epimastigotas aderidos há 12 horas, epimastigotas aderidos há 24 horas), foram sedimentadas a  $8.000 \times g$  por 20 minutos a  $10^{\circ}\text{C}$ .

As células foram lavadas em PBS 1X e centrifugadas novamente nas mesmas condições. As células foram lisadas com cerca de 5 ml de tampão de lise para RNA total. Imediatamente após a lise foram adicionados 7 volumes de cloreto de lítio 4 M e a mistura foi incubada a  $4^{\circ}\text{C}$  por 16 horas. Decorrido este tempo, os extratos celulares foram centrifugados a  $12.000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os sedimentos foram lavados com cerca de 100 ml de cloreto de lítio 3 M, centrifugados a  $12.000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e este processo foi repetido por mais duas vezes. Após essas lavagens, os sedimentos foram ressuspensos em cerca de 10 ml de tampão de ressuspensão de RNA total. A amostra foi submetida a um congelamento rápido (banho de gelo seco) e, logo após, o descongelamento foi feito através de incubações no banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , intercalados por uma forte agitação. A extração de RNA foi realizada, duas vezes, com igual volume de fenol saturado e posteriormente com fenol/clorofórmio. E finalmente, foi efetuada uma extração com clorofórmio/álcool isoamílico e, logo após, a fase aquosa foi precipitada com 10% do volume de acetato de sódio 3 M e um volume de isopropanol e armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

As amostras de RNA total foram purificados novamente utilizando o Kit *RNeasy* (Qiagen) onde foi também executado um último tratamento com atividade DNase, conforme recomendações do fabricante.

### **3.5.2 Isolamento de RNA associados aos polissomas**

Inicialmente, as células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com cicloheximida (concentração final de  $10 \mu\text{g/ml}$ ) em seus respectivos meios de cultura.

Cerca de  $5,0 \times 10^{10}$  células (epimastigotas, epimastigotas estressados, epimastigotas aderidos há 3, há 12, e há 24 horas) foram sedimentadas a  $8.000 \times g$  por 20 minutos a  $10^{\circ}\text{C}$  e lavadas três vezes em solução NKM. A lise celular foi efetuada com aproximadamente  $5 \times 10^8$  células em 20 mL de tampão de lise hipotônico sob forte homogeneização. Após homogeneização por 3 minutos, foi adicionado NP-40 a uma concentração final de 1% seguindo-se mais 2 minutos de homogeneização. A lise celular foi monitorada em microscópio óptico e interrompida pela adição de sacarose na concentração final de 0,25M. O lisado celular foi submetido a dois ciclos de centrifugação: um a  $12.000 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente a  $12.000 \times g$  por mais 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . As frações pós mitocôndrias obtidas após estas centrifugações foram distribuídas sobre um colchão de sacarose 2 M e centrifugadas a  $365.000 \times g$  por 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os sedimentos (fração polissomal) foram armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até serem processados.

Para a extração das frações polissomais dos diferentes estágios do parasita, cerca de 5,0 ml de solução de ressuspensão de polissomas foram adicionados aos sedimentos. Após a homogeneização, as suspensões foram submetidas, inicialmente, a uma extração pelo método de fenol saturado a quente (Scherrer, 1969) e em seguida a extração com fenol saturado a frio.

As amostras foram precipitadas com um volume de isopropanol e 10% do volume de acetato de sódio 3M e armazenadas em nitrogênio líquido. Os RNAs polissomais foram purificados novamente utilizando o Kit RNAeasy (Qiagen), onde foi também executado um último tratamento com atividade DNase, conforme recomendações do fabricante.

### 3.7 CONFECÇÃO DO MICROARRANJO

Visando a construção de um microarranjo de DNA que contivesse o conjunto das diferentes informações sobre os genes do parasita disponíveis até o momento, efetuamos uma busca nos bancos de dados internacionais sobre o depósito de diferentes seqüências de DNA do *T. cruzi*.

Com a utilização do programa cap 3 (Huang e Madan 1999), foi possível agrupar as seqüências do *T. cruzi* presentes no banco de dados EMBL (Release

62.0). A partir desses agrupamentos, foram sintetizados oligoiniciadores específicos para amplificação dos produtos a serem carimbados no microarranjo.

Hibridações competitivas foram realizadas marcando duas amostras de RNA (convertido em cDNA) com os fluoróforos Cy-3 e Cy-5 (*Amersham – Pharmacia Biotech*).

Após a hibridação, os microarranjos foram analisados em um *scanner* óptico Affymetrix 418 e os sinais de excitação dos diferentes fluoróforos foram usados para a criação de uma imagem composta de hibridação. A coloração de cada sinal de hibridação, em função da razão Intensidade Cy-3 / Intensidade Cy-5 permite identificar genes cuja expressão é regulada diferencialmente ao longo da metaciclogênese (Cheung e cols, 1999).

### **3.7.1 Amplificação do DNA oriundo da seleção de seqüências codificadores do *T.cruzi***

Com a utilização do programa cap 3 (Huang e Madan 1999), foi possível agrupar as 9919 ESTs (*express sequence tags*) do *T. cruzi* presentes no banco de dados EMBL (Release 62.0). As seqüências foram organizadas em 1655 agrupamentos que continham 6995 das seqüências, enquanto que 2924 permaneceram como únicas (*singletons*), sem similaridade detectável com outras seqüências do parasita.

Utilizamos as seqüências pesquisadas para o desenho de iniciadores sintéticos (*primers*) com auxílio do *software Primer Select (Lasergene – DNA Star)* para a amplificação de ~3650 seqüências, a partir do DNA genômico do parasita.

Alguns critérios básicos foram seguidos para o desenho os aligonucleotídeos iniciadores:

- Tamanho dos oligonucleotídeos entre 18 a 22 nucleotídeos
- A temperatura de hibridação do par iniciador deve ser ~ 55°C
- Os iniciadores não devem formar estruturas secundárias nas condições previstas de PCR
- Os iniciadores devem possuir C ou G na extremidade 3'
- Os produtos de PCR devem estar entre 150 a 600 pares de nucleotídeos

As seqüências selecionadas foram amplificadas com iniciadores específicos por reação em cadeia pela polimerase em placas de 96 poços.

A amplificação foi realizada em termociclador (*Gene Amp PCR System 977*), utilizando 92 µl do mix (10 µl tampão 10x com 15 mM de mgCl; 4 ul de dNTPs 2,5 mM; 0,1 µl de de DNA de Epimastigota a 100ng/µl; 0,4 ul de Taq polimerase 5U/µl [*invitrogen*]; 4 µl de oligonucleotídeo iniciador específico (5 pmol/µ).

Um programa de *touchdown* foi utilizado para amplificação: (desnaturação a 94°C por 1:30 minutos; 6X [94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 1:30 minutos]; 2X [ 94°C por 30 segundos, 57°C por 45 segundos, 72°C por 1:30 minutos]; 2X [ 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos, 72°C por 1:30 minutos]; 2X [ 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1:30 minutos]; 2X [ 94°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 1:30 minutos]; [ 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 1:30 minutos]; 24X [ 94°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos, 72°C por 1:30 minutos]; 72°C por 10 minutos e 4°C *forever*).

### **3.7.2 Purificação do DNA**

A purificação dos produtos amplificados foi realizada em placas de 96 poços para múltiplos produtos de PCR, seguindo as instruções do kit comercial *QIAquick Multiwell PCR Purification Handbook*.

### **3.7.3 Hibridação das amostras extraídas do parasita em diferentes estágios evolutivos:**

As amostras de RNA extraídos dos diferentes estágios evolutivos do parasita foram marcadas com diferentes fluoróforos e hibridizadas no microarranjo.

#### **3.7.3.1 Obtenção do cRNA**

Devido ao pouco rendimento obtido na extração de RNA dos parasitas nos diferentes estágios evolutivos, utilizamos neste trabalho RNA amplificado. O processo de obtenção do cRNA amplificado consiste em uma transcrição reversa

com um iniciador oligo(dT) acoplado a um promotor T7 e uma transcrição *in vitro* que gera milhares de cópias de RNA mensageiros.

Para amplificação do RNA utilizamos o Kit Amino Allyl MessageAmp™ – Ambiom seguindo as instruções do fabricante.

### 3.7.3.2 Conversão do cRNAs para cDNA e marcação com fluoróforos

Os cRNAs extraídos do parasita foram inicialmente convertidos para cDNA usando a enzima transcriptase reversa. Para a síntese da primeira fita de cDNA foram utilizados cerca de 1µg de cada um dos cRNAs das diferentes formas evolutivas do parasita, nos quais foram adicionados 400 mM de *Random Primer*, 0,2 mg do RNA de λQ e 0,5 µL do *primer\_antisense* de λQ. A reação foi incubada a 70°C por 10 minutos e colocada imediatamente no gelo. Foram acrescentados 6 µL de tampão para RT (Tris-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM); 3 µL de dNTPs 25 mM e 400 unidades da enzima transcriptase reversa (Superscript™ II), esta mistura foi incubada a 42°C por 1 hora. Decorrido este tempo, a reação foi interrompida com a adição de 15 µL de NaOH 0,1 N e incubação por mais 10 minutos a 70°C. Logo após, foi neutralizada com o acréscimo de 15 µL de HCl 0,1 N.

Para a concentração das amostras, 400 µL de água ultra pura e a reação da primeira fita foram depositados em colunas de microcon 30 (Microcon\_ Amicon Bioseparations, Millipore), e submetidos a centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos. As amostras concentradas foram coletadas em tubos de microcentrífuga e posteriormente desnaturadas a 95°C por 5 minutos e incubadas em gelo.

Para a síntese da segunda fita de cDNA foram acrescentados 20 µl de *Random primer solution*, 5 µL de mistura de dNTPs (dATPs 1,2 mM; dCTPs 0,6 mM; dGTPs 1,2 mM; dTTPs 1,2 mM), 2 µl de dinucleotídeos marcados com fluoróforos (dCTP-Cy-3 ou dCTP-Cy-5 -Amersham – Pharmacia Biotech) e 1 µl da enzima *Klenow*.

Esta reação foi incubada a 37°C por 2 horas e após este período, a reação foi purificada e concentrada em coluna de microcon 30 seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.



### 3.7.3.3 Hibridação nos microarranjos

O DNA marcado foi concentrado a um volume de 20 µl, misturado com 100 µl de solução de hibridação (Denhart's 5X, DNA esperma de salmão 0,25 mg/ml, Formamida 50%, SDS 0,1%, SSC 6X), desnaturado por 5 minutos a 95°C e colocados sob as lâminas de vidro. A lâmina foi incubada por cerca de 18 horas a 42°C em uma estação de hibridação (*Gene TAC Hybridization*).

Após o período de hibridação os procedimentos de lavagem foram efetuados de forma automatizada, com concentrações decrescentes de sal, à temperatura ambiente (solução de média estringência : 0,5X SSC + 0,01% SDS por 10 min.; solução de baixa estringência: 0,06 X SSC por 10 min). Para a hibridação dos microarranjos, foram realizados vários experimentos contendo réplicas, utilizando a combinação de moléculas de cDNA provenientes de RNA total e polissomal do parasita em diferentes estágios evolutivos , marcadas com diferentes fluoróforos.

## 3.8 LEITURA DOS SINAIS OBTIDOS

A leitura dos sinais foi feita através do sistema *Affymetrix 428 Array Scann*, que detecta os sinais emitidos pelos fluoróforos das amostras hibridadas. Os sinais foram obtidos pela medida da intensidade de fluorescência gerada por cada *spot* e captada nos canais verdes – excitação de Cy3 em 532 nm - e nos canais vermelhos – excitação do Cy5 em 635 nm - do *scanner* óptico.

A partir desses sinais foram criadas imagens em formato TIFF (*tag image file format*). Cada uma destas imagens representa a leitura dos sinais obtidos em um dos comprimentos de onda utilizados.

## 3.9 ANÁLISE DAS IMAGENS

As imagens criadas pela leitura dos sinais obtidos das hibridizações foram analisadas pelo *software Spot* (Bukley e Yang, 2000). Esse programa estabelece coordenadas para cada *spot* e delimita as áreas a serem analisadas, criando uma máscara de separação entre o *spot* e o restante da lâmina (*background*).

O valor dos pixels de cada *spot* gerada pela máscara morfológica foi usado para calcular o valor correspondente de um *spot*.

### 3.10 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS

A intensidade do *spot* representa uma medida relativa da concentração do mRNA alvo, obtido através da hibridação da sonda complementar. No entanto, muitas variáveis podem interferir na quantificação dessa medida. Essas variações são classificadas, geralmente, como técnicas, que podem ter diversas causas, destacando-se quantidades diferentes de mRNA em cada amostra, incorporação diferencial dos fluoróforos, diferenças na morfologia dos *spots* de acordo com o pino utilizado para a impressão da lâmina, parâmetros e estabilidade do *scanner* utilizado para a obtenção da imagem da hibridação.

Todas essas variações acabam incorporando erros à quantificação da concentração do mRNA gene-específica e podem ser corrigidas através do processo denominado normalização. A normalização eliminará eficazmente esses efeitos se eles forem relativamente gerais, isto é, afetem de forma idêntica todas as sondas ou, pelo menos, um conjunto relativamente grande de *spots*.

Existem diversas formas de realizar a normalização, e no presente trabalho escolhemos uma forma de normalização global, não-linear, através do método denominado loess (Dudoit e Yang, 2003; Smith, 2003).

A normalização global transforma os sinais obtidos, de forma que a maioria das sondas não apresenta expressão diferencial. Ela se baseia na premissa de que a maioria dos genes não apresenta expressão diferencial entre as duas amostras hibridadas na mesma lâmina. Embora em alguns casos essa premissa não seja mantida, ela é geralmente a situação mais verossímil ao se comparar duas amostras de mRNA, especialmente quando o microarranjo contém uma representação grande e não-tendenciosa do genoma, como é o caso do microarranjo de *T. cruzi* utilizado nesse trabalho. E mesmo nas situações nas quais ela não seja verdadeira, é muito difícil, se não impossível, definir qual seria a situação mais verossímil e a normalização global se apresenta como uma alternativa mais conservadora, diminuindo as diferenças entre as amostras estudadas.

O pacote de funções LIMMA (Smith, 2003), parte do projeto Bioconductor (Gentleman e cols, 2003), foi utilizado para a normalização dos dados.

### 3.11 RECONHECIMENTO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Para o reconhecimento de genes diferencialmente expressos foi utilizado um método estatístico denominado teste SAM (*Significant Analyses of microarray*) que constitui uma versão modificada do teste T (Tusher et al, 2001) e que é utilizado para identificar genes no microarranjo com mudanças na expressão.

Ele atribui um valor para cada gene, com base na mudança relativa da sua expressão e o desvio padrão dessa mesma mudança. Genes com valores maiores do que um limiar são considerados significativos.

Além de calcular uma estatística de expressão diferencial, o teste SAM fornece também uma medida de probabilidade de expressão gênica diferencial, a qual é denominada q, através do controle do FDR (*false Discovery rate*). O FDR pode ser descrito como a proporção esperada de falsos positivos entre os genes diferencialmente expressos.

O número de genes considerado diferencialmente expresso é definido pelo valor de FDR desejado, o qual representa uma medida estatística de confiabilidade, e pela razão de mudança (*fold change* – FC), a qual representa uma medida de confiança biológica.

Os valores de FDR e FC são, portanto, escolhidos como uma combinação de significância estatística e biológica, de acordo com a necessidade do pesquisador.

O reconhecimento dos genes diferencialmente expressos, em experimentos de hibridações, depende de observações repetidas de cada condição biológica a ser avaliada. As repetições permitem investigar as variabilidades associadas aos procedimentos experimentais.

### 3.12 BUSCA SISTEMÁTICA DOS GENES DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSSOMO NO BANCO DE DADOS DE *T. CRUZI*

Através do site <http://www.genedb.org/genedb/tcruzi/>, o qual contém a versão mais recente do genoma de *T. cruzi*, foi realizada uma busca usando palavras-

chaves: “ubiquitin e proteasome” que estivessem presentes na anotação do genoma versão 3.0 feita pelo TIGR. Esta busca teve como principal propósito saber qual a cobertura do nosso microarranjo para os genes do sistema proteossomo-ubiquitina, além de poder descrever de forma geral a composição gênica deste sistema em *T. cruzi*.

## 4. RESULTADOS

Para iniciar a caracterização da via proteolítica ubiquitina-proteossomo em *T. cruzi* foi realizada uma busca no banco de dados de *T. cruzi* por genes anotados para a via. Essa busca permitiu avaliar a representatividade do microarranjo, confeccionado por nossa equipe, sobre estes genes visando obter as informações sobre a modulação da expressão dos genes envolvidos no sistema, durante o início da metaciclogênese.

### 4.1 ANÁLISE DOS GENES DO SISTEMA PROTEOLÍTICO MEDIADO POR PROTEOSSOMO DEPENDENTE DE UBIQUITINA E ATP NO *T. CRUZI*.

A fim de avaliar a representatividade do nosso biochip para essa via foi realizada uma busca no banco de dados de *T. cruzi* no site <<http://www.genedb.org/genedb/tcruzi/>> através de duas palavras chaves: ubiquitin e proteasome. Os resultados se referem a montagem do genoma versão 3.0, liberada em julho de 2004.

Nessa busca os campos procurados na anotação foram nomes do gene e motivos presentes na proteína. Portanto, apesar da procura ter sido feita somente para seqüências anotadas, usando busca de texto, também foram selecionados genes que codificam para proteínas com motivos contendo as palavras-chaves, e, portanto, suas anotações funcionais podem não apresentar essas palavras-chaves.

A pesquisa revelou a quantidade dos genes já anotados para o sistema e permitiu identificar quais estão presentes no microarranjo utilizado nesse trabalho.

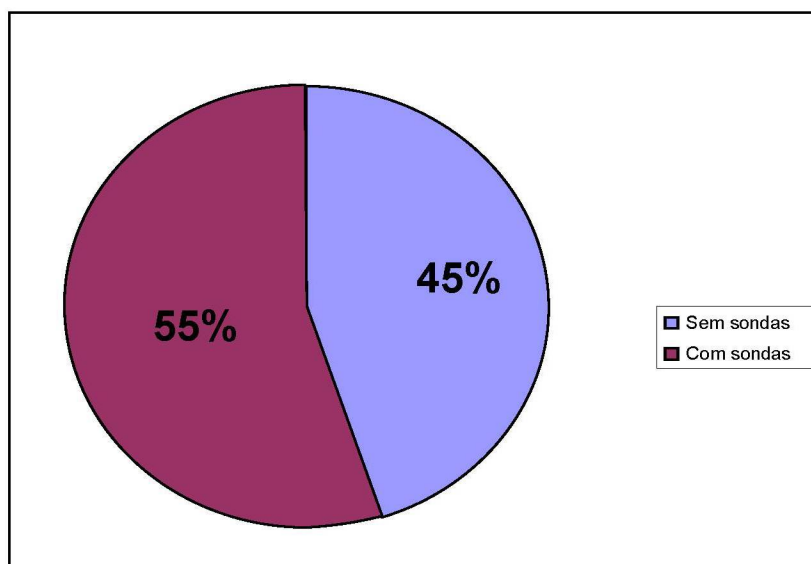
Nesta pesquisa foram encontrados 232 genes anotados, sendo que 106 possuem sondas no microarranjo de *T. cruzi*. Isto significa uma cobertura aproximada de 45% para a via.

Foram encontrados 89 genes anotados para o proteossomo 26S sendo que 49 estão representados no microarranjo de *T. cruzi*. Para a família das ubiquitinas foram encontrados 143 genes anotados sendo que 57 deles possuem sondas representantes no microarranjo de *T. cruzi*.

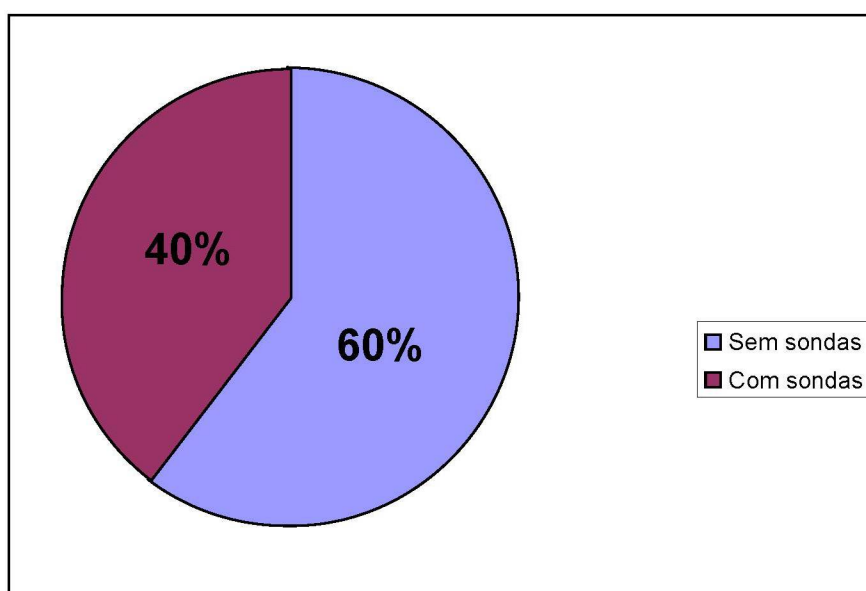
Os gráficos 1 e 2 representam as porcentagens da cobertura do microarranjo quanto aos genes do proteossomo e da família das ubiquitinas, respectivamente.

A tabela 1 contém todos os genes encontrados para o proteossomo e suas identificações no microarranjo (em vermelho), quando existe. Do mesmo modo, a tabela 2 contém os genes para família das ubiquitinas.

**GRAFICO 1.** Genes de proteassomo cobertos pelo microarranjo do *T. cruzi*.



**GRAFICO 2.** Genes da família das ubiquitinas cobertos pelo microarranjo de *T. cruzi*.



**Tabela 1.** Genes do proteossomo identificados no genoma de *T. cruzi*, com as sondas relativas presentes no microarranjo e, em negrito, os genes selecionados para análise da expressão gênica.

| Anotação funcional do gene  | Sonda                  | ID do gene             |
|---|------------------------|------------------------|
| proteasome alpha 1 subunit, putative  | MG_24H_03_C10          | Tc00.1047053506327.10  |
| proteasome alpha 1 subunit, putative  | CTG_2465               | Tc00.1047053506885.350 |
| proteasome alpha 2 subunit, putative  | CTG_1178               | Tc00.1047053504069.10  |
| proteasome alpha 3 subunit, putative  | CTG_1602               | Tc00.1047053506985.30  |
| proteasome alpha 5 subunit, putative  | CTG_1458               | Tc00.1047053504069.53  |
| proteasome alpha 7 subunit, putative  | CTG_1076, CTG_1671     | Tc00.1047053507775.50  |
| proteasome beta-1 subunit, putative   | Sem sondas             | Tc00.1047053509429.110 |
| proteasome beta 2 subunit, putative   | Sem sondas             | Tc00.1047053508461.430 |
| proteasome beta 3 subunit, putative   | Sem sondas             | Tc00.1047053506779.50  |
| proteasome beta 5 subunit, putative   | MG_24H_13_F07          | Tc00.1047053503781.70  |
| proteasome beta 6 subunit, putative, 20S  | CTG_1172               | Tc00.1047053508577.160 |
| proteasome beta 6 subunit, putative   |                        |                        |
| proteasome beta 7 subunit, putative   | Sem sondas             | Tc00.1047053510689.30  |
| proteasome regulatory ATPase subunit 1, putative  | Sem sondas             | Tc00.1047053509207.160 |
| proteasome regulatory ATPase subunit 2, putative  | Sem sondas             | Tc00.1047053511047.50  |
| proteasome regulatory ATPase subunit 3, putative  | Sem sondas             | Tc00.1047053509429.270 |
| proteasome regulatory ATPase subunit 5, putative  | IB_MT_01_A01, CTG_1070 | Tc00.1047053506859.20  |
| proteasome regulatory ATPase subunit 6  | Sem sondas             | Tc00.1047053504147.200 |
| 26S proteasome regulatory non-ATPase subunit 1, putative, 7717.t00036   | Sem sondas             | Tc00.1047053504221.20  |
| proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 2, putative   | CTG_2422               | Tc00.1047053510901.150 |
| proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 3, putative   | Sem sondas             | Tc00.1047053508355.150 |
| proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 5, putative, 19S proteasome regulatory subunit  | CTG_242                | Tc00.1047053506977.90  |
| proteasome regulatory non-ATPase subunit 6, putative  | Sem sondas             | Tc00.1047053503513.40  |
| proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 7, putative   | IB_MT_07_A12           | Tc00.1047053508707.90  |
| proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 8, putative, 26S proteasome regulatory subunit, putative                                | Sem sondas             | Tc00.1047053511285.90  |
| proteasome 26S non-ATPase subunit 9, putative   | MG_24H_13_F04          | Tc00.1047053506743.150 |
| proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 11, putative, 19S proteasome regulatory subunit, Metallo-peptidase, Clan MP, Family M67 | Sem Sondas             | Tc00.1047053509627.30  |
| proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 12, putative  | CTG_3343               | Tc00.1047053511725.10  |
| 26S protease regulatory subunit, putative, serine peptidase, Clan SJ, family S16, putative  | Sem sondas             | Tc00.1047053510265.20  |
| AAA ATPase, putative  | CTG_1223               | Tc00.1047053509233.70  |
| AAA family ATPase, conserved  | Sem sondas             | Tc00.1047053511745.20  |
| AAA family ATPase, putative   | Sem sondas             | Tc00.1047053510359.170 |
| ATPase domain protein, putative   | CTG_2969               | Tc00.1047053509877.80  |
| ATPase, putative  | Sem sondas             | Tc00.1047053506297.110 |
| ATPase, putative  | CTG_3579               | Tc00.1047053506925.410 |
| ATPase-like protein   | Sem sondas             | Tc00.1047053510901.90  |
| ATP-dependent chaperone, putative   | CTG_4493               | Tc00.1047053505945.50  |
| ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (HSP100), putative, Serine peptidase, putative                         | Sem sondas             | Tc00.1047053506821.20  |
| ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 78 (HSP78), putative, serine peptidase, putative                           | CTG_3312, CTG_2549     | Tc00.1047053508737.100 |
| ATP-dependent zinc metallopeptidase, putative, metallo-peptidase, Clan MA(E) family M41   | CTG_3951, CTG_4385     | Tc00.1047053511277.170 |
| beta-adaptin 3, putative  | Sem sondas             | Tc00.1047053506673.60  |

Tabela 1. Continuação.

| Anotação funcional do gene   | Sonda                            | ID do gene             |
|--|----------------------------------|------------------------|
| cyclosome subunit, possible, conserved   | Sem sondas                       | Tc00.1047053511507.30  |
| eukaryotic translation initiation factor, putative   | Sem sondas                       | Tc00.1047053509205.30  |
| hs1vu complex proteolytic subunit-like,  | CTG_1427, CTG_853                | Tc00.1047053506275.20  |
| hypothetical protein   | MG_24H_18_G02, CTG_4347          | Tc00.1047053503703.60  |
| hypothetical protein   | Sem sondas                       | Tc00.1047053506925.330 |
| hypothetical protein   | CTG_4507                         | Tc00.1047053511211.140 |
| hypothetical protein, conserved  | Sem sondas                       | Tc00.1047053507801.110 |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_111, CTG_213                 | Tc00.1047053511317.50  |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_3647                         | Tc00.1047053508707.60  |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_1428                         | Tc00.1047053510741.60  |
| hypothetical protein, conserved  | MG_EP_04_E01, MG_EP_03_G01       | Tc00.1047053509805.30  |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_2649                         | Tc00.1047053503779.100 |
| hypothetical protein, conserved  | Sem sondas                       | Tc00.1047053507883.60  |
| hypothetical protein, conserved  | Sem sondas                       | Tc00.1047053509965.340 |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_1832                         | Tc00.1047053507941.30  |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_1201                         | Tc00.1047053507093.140 |
| hypothetical protein, conserved  | MG_24H_09_C04                    | Tc00.1047053506697.60  |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_2094                         | Tc00.1047053509715.130 |
| hypothetical protein, conserved  | MG_24H_09_H03, MG_24H_09_H04     | Tc00.1047053508647.160 |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_686, MG_EP_06_G07            | Tc00.1047053510423.40  |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_3555                         | Tc00.1047053506247.160 |
| hypothetical protein, conserved  | MG_ST_14_A10, IB_ST_01_D01       | Tc00.1047053510667.20  |
| hypothetical protein, conserved  | Sem sondas                       | Tc00.1047053507099.10  |
| hypothetical protein, conserved  | Sem sondas                       | Tc00.1047053508179.50  |
| hypothetical protein, conserved  | MG_24H_17_H02, CTG_3815, CTG_569 | Tc00.1047053504033.180 |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_596                          | Tc00.1047053508479.260 |
| hypothetical protein, conserved  | CTG_550, CTG_1119                | Tc00.1047053511301.120 |
| hypothetical protein   | Sem Sondas                       | Tc00.1047053503697.9   |
| hypothetical protein   | CTG_3343                         | Tc00.1047053509489.29  |
| hypothetical protein   | Sem Sondas                       | Tc00.1047053481099.9   |
| hypothetical protein 4969.t00002   | Sem sondas                       | Tc00.1047053508409.9   |
| hypothetical protein 7183.t00001   | IB_MT_07_A12                     | Tc00.1047053509073.119 |
| hypothetical protein 8421.t00001   | Sem sondas                       | Tc00.1047053510531.109 |
| katanin, putative  | CTG_3971                         | Tc00.1047053509695.50  |
| katanin, putative, Serine peptidase, Clan SJ, family S16, putative   | Sem sondas                       | Tc00.1047053508821.10  |
| katanin, putative, Serine peptidase, Clan SJ, family S16, putative   | Sem sondas                       | Tc00.1047053506163.80  |
| katanin-like protein, serine peptidase, Clan SJ, family S16, putative  | IB_MT_08_E02                     | Tc00.1047053508153.330 |
| katanin-like protein, serine peptidase, Clan SJ, family S16, putative  | Sem sondas                       | Tc00.1047053508533.30  |
| katanin-like protein, serine peptidase, Clan SJ, family S16, putative  | CTG_2500, CTG_2430, CTG_3084     | Tc00.1047053506733.40  |
| mitochondrial ATP-dependent zinc metalloproteinase, putative, metallo-peptidase, Clan MA(E) family M41                       | CTG_3306                         | Tc00.1047053509717.60  |
| peroxisome assembly protein, putative  | Sem sondas                       | Tc00.1047053506947.40  |
| peroxisome biogenesis factor 1, putative   | Sem sondas                       | Tc00.1047053508693.90  |
| proteasome activator protein PA26, putative  | CTG_1733                         | Tc00.1047053511001.240 |
| proteasome activator protein PA26, putative  | Sem sondas                       | Tc00.1047053503841.10  |
| vacuolar transport protein 4A, putative  | CTG_3710                         | Tc00.1047053511003.140 |
| vesicle-fusing ATPase, putative, vesicular-fusion protein NSF, putative, N-ethylmaleimide sensitive fusion protein, putative | CTG_3169                         | Tc00.1047053508995.40  |
| vesicular transport protein (CDC48 homologue)  | Sem Sondas                       | Tc00.1047053506629.80  |



**Tabela 2.** Genes da família das ubiquitinas identificados no genoma de *T. cruzi*, com as sondas relativas presentes no microarranjo e, em negrito, os genes selecionados para análise da expressão gênica.

| Anotação funcional do gene   | Sonda                                       | ID do gene                    |
|--|---|-------------------------------|
| ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C12, putative                          | Sem sondas                                  | Tc00.1047053419703.20         |
| <b>ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C12, putative</b>                   | <b>IB_ST_02_E01</b>                         | <b>Tc00.1047053504109.90</b>  |
| ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053507087.30         |
| <b>ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative</b>                                     | <b>CTG_2870</b>                             | <b>Tc00.1047053507507.40</b>  |
| ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053508153.120        |
| ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053508355.380        |
| <b>ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative</b>                                     | <b>CTG_3474</b>                             | <b>Tc00.1047053507053.100</b> |
| ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053508277.360        |
| ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative  | Sem sondas                                  | c00.1047053510749.40          |
| ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053509073.30         |
| ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053509429.250        |
| ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053510761.70         |
| <b>ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative</b>                                     | <b>CTG_4207</b>                             | <b>Tc00.1047053504131.170</b> |
| ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053509965.40         |
| <b>ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative</b>                                     | <b>MG_24H_12_G08, CTG_4431</b>              | <b>Tc00.1047053507017.120</b> |
| <b>ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, family C19, putative</b>                                     | <b>CTG_31</b>                               | <b>Tc00.1047053509955.10</b>  |
| <b>ubiquitin/ribosomal protein S27a, putative</b>  | <b>CTG_808</b>                              | <b>Tc00.1047053509937.100</b> |
| ubiquitin activating E1 enzyme, putative   | Sem sondas                                  | Tc00.1047053507711.150        |
| ubiquitin activating enzyme, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053510155.120        |
| <b>ubiquitin activating enzyme, putative</b>   | <b>MG_EP_04_H05</b>                         | <b>Tc00.1047053508177.100</b> |
| ubiquitin-activating enzyme E1, putative   | Sem sondas                                  | Tc00.1047053504427.250        |
| <b>ubiquitin-activating enzyme E1, putative, 8480.t00025</b>   | <b>CTG_4054, IB_MT_04_C06, IB_MT_05_F10</b> | <b>Tc00.1047053510743.10</b>  |
| ubiquitin-activating enzyme, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053509777.100        |
| ubiquitin-activating enzyme, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053504131.30         |
| ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053506859.10         |
| <b>ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative</b>   | <b>CTG_3090</b>                             | <b>Tc00.1047053506635.90</b>  |
| <b>ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative</b>   | <b>MG_EP_06_B06</b>                         | <b>Tc00.1047053511071.70</b>  |
| <b>ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative</b>   | <b>CTG_708, IB_ST_02_H01</b>                | <b>Tc00.1047053511907.270</b> |
| ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053511179.160        |
| ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative  | Sem sondas                                  | Tc00.1047053506435.300        |
| <b>ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative</b>   | <b>CTG_1159</b>                             | <b>Tc00.1047053453445.20</b>  |
| ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative, ubiquitin-protein ligase, putative, ubiquitin carrier protein, putative | Sem sondas                                  | Tc00.1047053509607.10         |
| <b>ubiquitin-conjugating enzyme protein, putative</b>  | <b>MG_ST_11_D11</b>                         | <b>Tc00.1047053511727.40</b>  |
| <b>ubiquitin-conjugating enzyme variant Kua homologue, putative</b>  | <b>CTG_3992</b>                             | <b>Tc00.1047053511367.210</b> |

Tabela 2. Continuação

| Anotação funcional do gene                         | Sonda                                    | ID do gene                    |
|--|--|-------------------------------|
| ubiquitin-conjugating enzyme, putative             | Sem sondas                               | Tc00.1047053507715.80         |
| ubiquitin-conjugating enzyme, putative             | Sem sondas                               | Tc00.1047053508387.100        |
| <b>ubiquitin-conjugating enzyme-like, putative</b> | <b>MG_EP_04_A05</b>                      | <b>Tc00.1047053509591.10</b>  |
| <b>ubiquitin-like protein</b>                      | <b>CTG_1410, CTG_598</b>                 | <b>Tc00.1047053506737.70</b>  |
| <b>ubiquitin-like protein, putative</b>            | <b>CTG_2457, CTG_2344</b>                | <b>Tc00.1047053506583.30</b>  |
| <b>ubiquitin ligase, putative</b>                  | <b>MG_24H_07_H06, CTG_1472</b>           | <b>Tc00.1047053511555.60</b>  |
| <b>ubiquitin-protein ligase, putative</b>          | <b>Sem sondas</b>                        | <b>Tc00.1047053506251.130</b> |
| <b>ubiquitin-protein ligase, putative</b>          | <b>CTG_3858</b>                          | <b>Tc00.1047053509053.10</b>  |
| <b>ubiquitin-protein ligase, putative</b>          | <b>CTG_3947</b>                          | <b>Tc00.1047053508231.60</b>  |
| hypothetical protein                               | CTG_506                                  | Tc00.1047053503939.70         |
| hypothetical protein                               | Sem sondas                               | Tc00.1047053506979.40         |
| hypothetical protein                               | CTG_1161                                 | Tc00.1047053507041.50         |
| hypothetical protein                               | CTG_4016                                 | Tc00.1047053511725.280        |
| hypothetical protein                               | Sem sondas                               | Tc00.1047053510611.10         |
| hypothetical protein                               | Sem sondas                               | Tc00.1047053510253.10         |
| hypothetical protein                               | Sem sondas                               | Tc00.1047053507765.140        |
| hypothetical protein                               | Sem sondas                               | Tc00.1047053509895.50         |
| hypothetical protein                               | Sem sondas                               | Tc00.1047053510351.110        |
| hypothetical protein                               | Sem sondas                               | Tc00.1047053508525.60         |
| hypothetical protein                               | CTG_3803                                 | Tc00.1047053508299.50         |
| hypothetical protein                               | MG_24H_10_H09,<br>CTG_3897, MG_EP_03_D04 | Tc00.1047053508285.20         |
| hypothetical protein                               | Sem sondas                               | Tc00.1047053507669.50         |
| hypothetical protein                               | Sem sondas                               | Tc00.1047053504057.50         |
| hypothetical protein                               | Sem sondas                               | Tc00.1047053510241.10         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053509733.130        |
| hypothetical protein, conserved                    | CTG_2318                                 | Tc00.1047053511071.80         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053507023.210        |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053508409.230        |
| hypothetical protein, conserved                    | MG_24H_12_H02                            | Tc00.1047053511239.120        |
| hypothetical protein, conserved                    | CTG_800                                  | Tc00.1047053503833.50         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053511817.130        |
| hypothetical protein, conserved                    | MG_24H_09_G02, CTG_3015                  | Tc00.1047053510729.50         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053503723.10         |
| hypothetical protein, conserved                    | CTG_427, CTG_2057                        | Tc00.1047053503893.60         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053509647.160        |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053511245.20         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053503465.10         |
| hypothetical protein, conserved                    | CTG_4232                                 | Tc00.1047053509005.70         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053504071.60         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053511725.160        |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053509179.60         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053504179.80         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053508543.40         |
| hypothetical protein, conserved                    | IB_EP_16_E10                             | Tc00.1047053508257.250        |
| hypothetical protein, conserved                    | CTG_793, CTG_128                         | Tc00.1047053511909.70         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053508111.40         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053507737.20         |
| hypothetical protein, conserved                    | MG_EP_07_B08, CTG_1761                   | Tc00.1047053506691.80         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053509393.20         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053510879.60         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053509109.180        |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053508461.520        |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053508479.240        |
| hypothetical protein, conserved                    | CTG_2708                                 | Tc00.1047053506999.50         |
| hypothetical protein, conserved                    | Sem sondas                               | Tc00.1047053511003.80         |
| hypothetical protein, conserved                    | CTG_3586, CTG_3774                       | Tc00.1047053507099.40         |

Tabela 2. Continuação

| Anotação funcional do gene  | Sonda                        | ID do gene                   |
|---|------------------------------|------------------------------|
| hypothetical protein, conserved   | CTG_2385                     | Tc00.1047053504147.190       |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053510143.70        |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053508543.110       |
| hypothetical protein, conserved   | IB_MT_03_H07                 | Tc00.1047053508177.30        |
| hypothetical protein, conserved   | CTG_4071                     | Tc00.1047053511367.350       |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053511367.190       |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053509979.40        |
| hypothetical protein, conserved   | CTG_2065                     | Tc00.1047053510039.60        |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053506401.130       |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053506829.50        |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053504797.110       |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053509669.90        |
| hypothetical protein, conserved   | CTG_2478                     | Tc00.1047053509507.10        |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053506355.10        |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053504253.50        |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053510323.50        |
| hypothetical protein, conserved   | MG_EP_03_F06, CTG_141        | Tc00.1047053511469.40        |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053509799.20        |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053506989.140       |
| hypothetical protein, conserved   | Sem sondas                   | Tc00.1047053510349.40        |
| hypothetical protein, conserved, 8232.t00007  | Sem sondas                   | Tc00.1047053507875.10        |
| hypothetical protein, conserved, 8292.t00001  | Sem sondas                   | Tc00.1047053510065.60        |
| hypothetical protein, conserved, 8456.t00006  | Sem sondas                   | Tc00.1047053510657.70        |
| hypothetical protein  | Sem sondas                   | Tc00.1047053503515.14        |
| hypothetical protein  | CTG_138                      | Tc00.1047053508303.4         |
| hypothetical protein  | MG_24H_07_H06                | Tc00.1047053506621.14        |
| hypothetical protein  | Sem sondas                   | Tc00.1047053506559.59        |
| hypothetical protein  | Sem sondas                   | Tc00.1047053510661.19        |
| hypothetical protein  | Sem sondas                   | Tc00.1047053447255.4         |
| hypothetical protein  | CTG_808                      | Tc00.1047053510409.39        |
| hypothetical protein  | Sem sondas                   | Tc00.1047053507031.29        |
| hypothetical protein  | Sem sondas                   | Tc00.1047053511655.69        |
| hypothetical protein  | CTG_1260                     | Tc00.1047053508461.19        |
| hypothetical protein  | Sem sondas                   | Tc00.1047053507629.39        |
| hypothetical protein, 5816.t00001   | Sem sondas                   | Tc00.1047053509953.9         |
| hypothetical protein, 7041.t00002   | MG_ST_09_B10                 | Tc00.1047053506655.14        |
| hypothetical protein, 8363.t00001   | Sem sondas                   | Tc00.1047053508185.19        |
| kinesin, putative   | CTG_3229, CTG_3269           | Tc00.1047053508579.30        |
| myosin head (motor domain), putative  | Sem sondas                   | Tc00.1047053509663.10        |
| myosin heavy chain kinase A, putative   | IB_MT_01_H05                 | Tc00.1047053509011.100       |
| myosin heavy chain, putative, myosin heavy chain, putative                                    | Sem sondas                   | Tc00.1047053511527.70        |
| nascent polypeptide associated complex subunit, putative                                      | CTG_824                      | Tc00.1047053510241.60        |
| phosphodiesterase, putative   | Sem sondas                   | Tc00.1047053509805.20        |
| phosphodiesterase, putative   | Sem sondas                   | Tc00.1047053511269.40        |
| <b>polyubiquitin, putative, 6526.t00002</b>   | <b>MG_ST_05_G01</b>          | <b>Tc00.1047053505169.10</b> |
| <b>polyubiquitin, putative, 6925.t00004</b>   | <b>MG_ST_09_B10, CTG_587</b> | <b>Tc00.1047053506391.50</b> |
| replication factor C, subunit 2, putative   | MG_24H_11_G11, CTG_3610      | Tc00.1047053511517.80        |
| <b>small ubiquitin protein, putative</b>  | <b>CTG_4070</b>              | <b>Tc00.1047053507809.70</b> |
| structural maintenance of chromosome (SMC), putative  | Sem sondas                   | Tc00.1047053511633.60        |
| tubulin-specific chaperone, putative  | Sem sondas                   | hc00.1047053511277.350       |
| ubiquitin fusion degradation protein 2, putative, ubiquitin conjugation factor E4 B, putative | CTG_2535                     | Tc00.1047053509053.110       |
| UV excision repair RAD23-like protein   | IB_MT_19_B01                 | Tc00.1047053511731.10        |
| zinc finger protein 2, putative   | Sem sondas                   | Tc00.1047053401469.10        |

## 4.2 CONFECÇÃO DO MICROARRANJO

### 4.2.1 Amplificação das sondas e deposição na lâmina de vidro

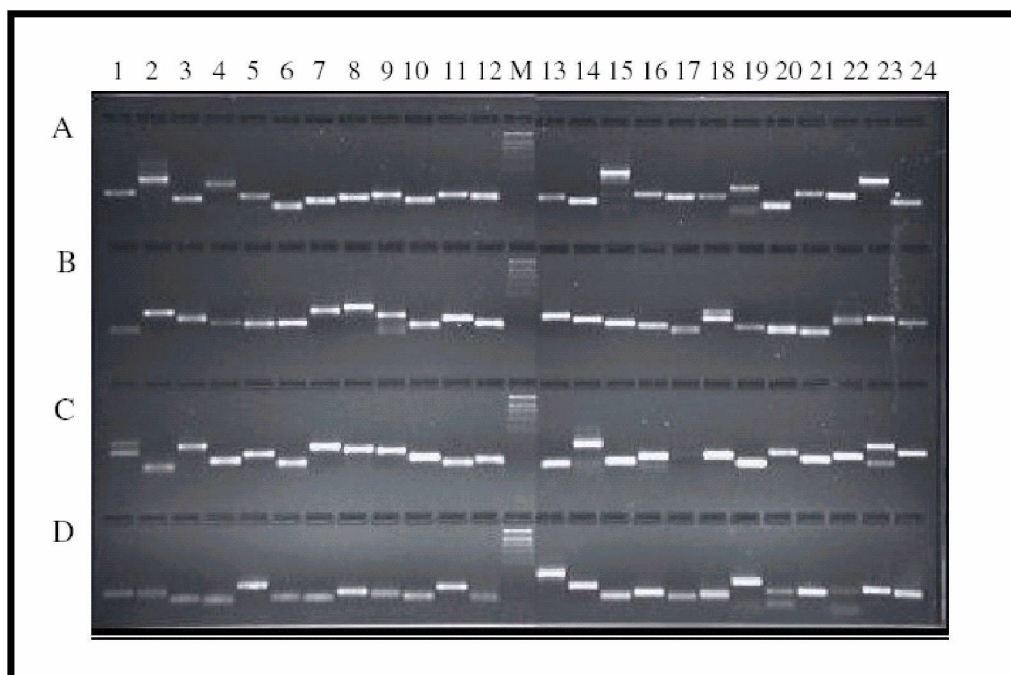
Cerca de 3.650 seqüências codificadoras de *T. cruzi* foram selecionadas e pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados com auxílio do software *Primer Select (Lasergene – DNA Star)* para cada uma destas seqüências.

Foram realizadas reações de PCR com os pares iniciadores específicos em placas de 96 poços para a amplificação dos produtos, posterior purificação e deposição na lâmina de vidro.

Controles internos também foram amplificados a partir dos genes que codificam para tubulina, proteína ligante de cauda poli A (PABP) (Batista e cols, 1994) e a fosfo-enol-piruvato-carboxiquinase (PEPCK) (Linss e cols. 1993) Os controles externos foram obtidos a partir da amplificação de sondas complementares a uma seqüência do gene Q do bacteriófago do lambda, em diferentes concentrações.

O tamanho dos produtos de PCR variou entre 0,1 a 0,55 kb. Cerca de 85% das seqüências foram amplificadas satisfatoriamente. Desta porcentagem, 69% dos fragmentos tiveram uma amplificação satisfatória já no primeiro experimento, ou seja, apresentaram uma banda forte sem amplificações inespecíficas; em 10% das seqüências amplificadas, as bandas apresentaram-se fracas e aproximadamente 5% mostravam a presença de bandas extras, o que acarretou a utilização de diferentes condições de PCR para esses grupos. A corrida eletroforética em gel de agarose de alguns desses fragmentos pode ser visualizada na figura 5.

**Figura 5.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo de algumas seqüências amplificadas a partir da reação de amplificação em cadeia pela polimerase com a utilização dos oligonucleotídeos específicos para o microarranjo de *T. cruzi*.



Seqüências obtidas de bibliotecas normalizadas construídas por nossa equipe, de varias populações do parasita em diferentes estágios da metaciclogênese (epimastigotas, epimastigotas submetidos ao estresse nutricional, epimastigotas em diferenciação e tripomastigotas metacíclicos), foram também amplificadas, purificadas e depositadas na lâmina de vidro.

As sondas e controles estão dispostos em 16 setores de 20 linhas e 20 colunas, num total de 6.144 posições dispostas em triplicata na lâmina, o que permite uma maior confiabilidade na análise dos dados, e com uma estimativa de cobertura de aproximadamente 4.500 genes de *T. cruzi*, pois há alguns genes que são cobertos por mais de uma sonda, distintas entre si. Foram depositados neste microarranjo os seguintes produtos de PCR:

- 3990 produtos de PCR obtidas em bancos de dados, sendo 3642 seqüências diferentes e os restantes constituídos de repetições destas sondas;
- 13 produtos da amplificação do gene do Q do bacteriófago lambda;
- 24 produtos da amplificação do gene da tubulina;

- 24 produtos da amplificação do gene da PABP;
- 25 produtos da amplificação do gene da PEPCK;
- 1935 produtos da amplificação de insertos da biblioteca de DNA complementar construídas no vetor de clonagem pGEM T-easy;
- 123 produtos da amplificação, referentes a diversos genes de interesse a outros projetos em andamento no Instituto de Biologia Molecular do Paraná.

Após a deposição, o DNA foi fixado à lâmina através de exposição a luz ultra violeta.

#### **4.2.2 Purificação do DNA**

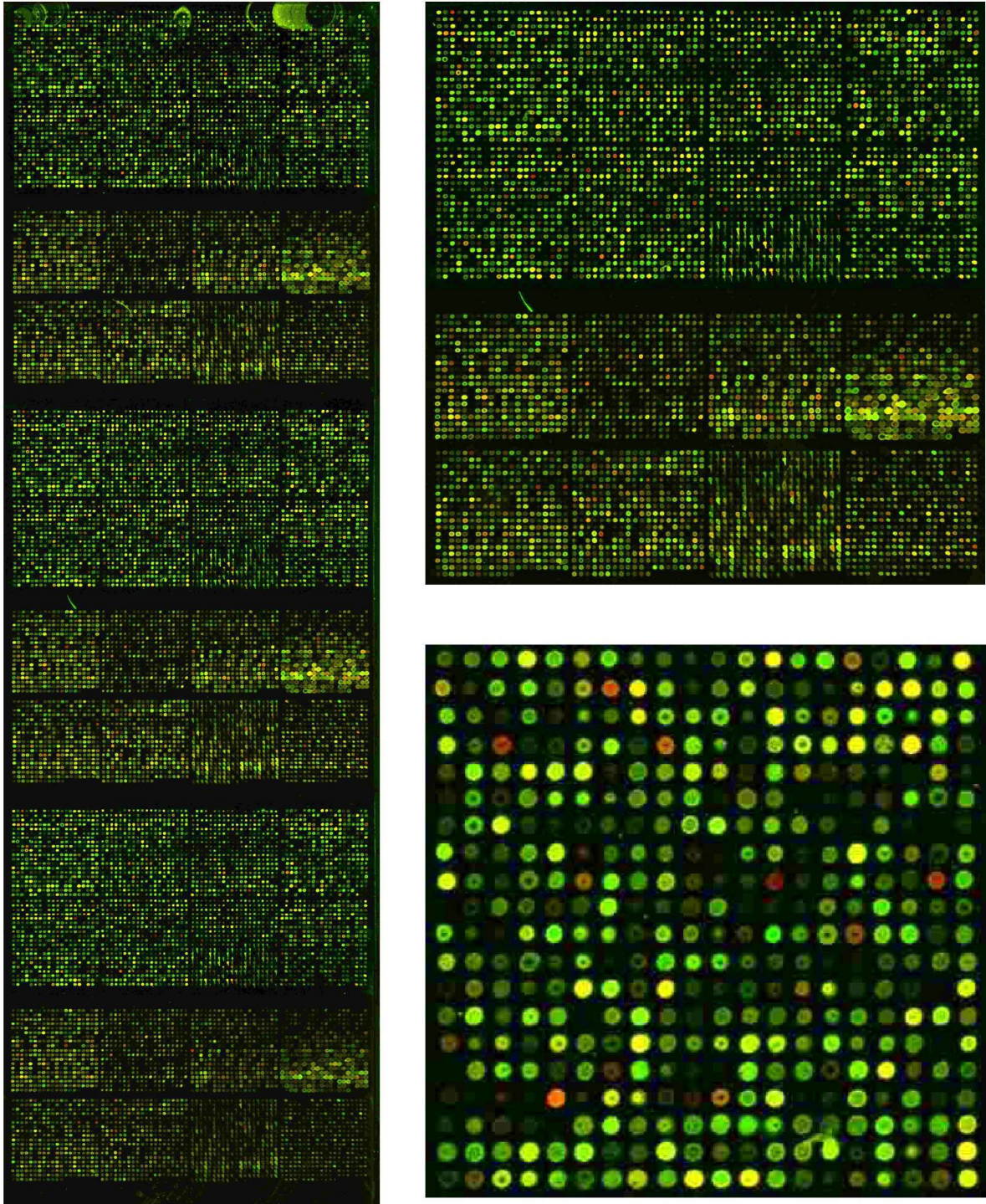
A purificação dos produtos amplificados foi realizada em placas de 96 poços para múltiplos produtos de PCR, seguindo o protocolo do kit comercial *QIAquick Multiwell PCR Purification Handbook*. O produto purificado foi transferido para placas de 384 poços, em 10 µl de uma solução de DMSO 50% (dimetilsufóxido), para a desnaturação da dupla fita de DNA.

#### **4.2.3 Produção do microarranjo**

Dentre os métodos para a impressão, a tecnologia usada neste trabalho foi a de aplicação direta do produto sobre a superfície da lâmina. Essa tecnologia possui um sistema de controle de movimento ligado a vários pinos os quais usam a capilaridade para carregar as amostras da placa de 384 poços até a lâmina de vidro onde a deposição é feita com um contato mínimo. A figura 6 mostra o aspecto da lâmina contendo o microarranjo utilizado neste trabalho.



**Figura 6.** Aspecto geral do microarranjo de T.cruzi. À esquerda, 18.432 sondas presentes em triplicata. À direita, uma unidade básica do microarranjo (6.144 sondas) e um setor do microarranjo espotado por um mesmo pino (total de 16 setores por unidade básica)



### 4.3 HIBRIDAÇÕES E ANÁLISES DOS DADOS OBTIDOS DO MICROARRANJO

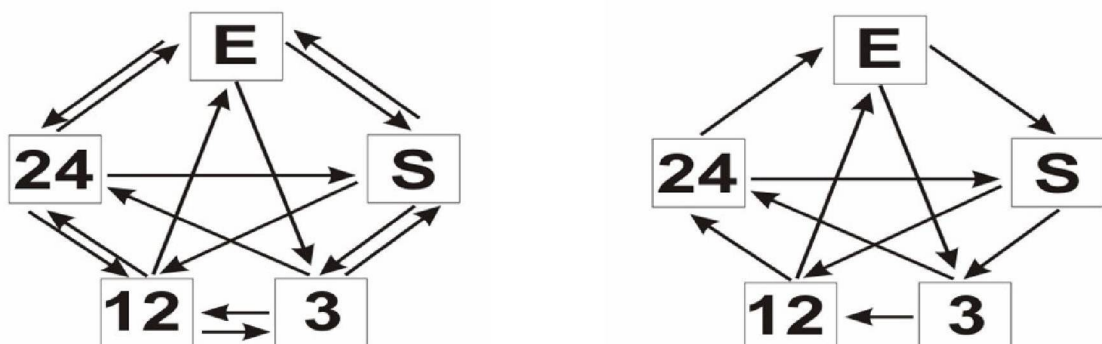
Os RNAs das frações total e polissomal de diferentes populações do *T. cruzi* foram isolados e marcados separadamente com fluoróforos distintos. As hibridações foram realizadas em várias réplicas com amostras oriundas de duas metaciclogênese independentes denominadas Met16 e Met19. A análise dos RNA total e polissomal possibilita a investigação dos mecanismos envolvidos no controle pós-transcricional da expressão gênica durante a diferenciação celular.

Para as hibridações, foram utilizados RNA total e RNA polissomal das seguintes populações celulares do *T. cruzi* :

- RNA de epimastigota em fase logarítmica de crescimento (E).
- RNA de epimastigota após 2 horas de estresse nutricional (S).
- RNA de epimastigotas aderidos há 3 horas de diferenciação (3),
- RNA de epimastigotas aderidos há 12 horas de diferenciação (12).
- RNA de epimastigotas aderidos há 24 horas de diferenciação (24).

A organização das hibridações pode ser vista na figura 7, nas quais cada seta representa uma hibridação distinta, e por convenção define-se que a ponta da seta representa a amostrada marcada com o fluoróforo Cy5.

**Figura 7.** Diagrama representando o esquema de hibridações utilizados para os experimentos de metaciclogênese Met16 (esquerda) e Met19 (direita). Cada seta indica uma hibridação e a ponta da mesma, por convenção, identifica a amostra marcada com fluoróforo Cy5.





As amostras marcadas foram colocadas em contato com a lâmina carimbada com DNA, na estação de hibridação e deixadas por um período de 12 a 18 horas, para que ocorresse a hibridação.

Após a hibridização, os microarranjos foram lidos em um scanner óptico (*Affymetrix 418*) e os sinais de excitação dos diferentes fluoróforos foram usados para a criação de uma imagem composta. A coloração de cada sinal de hibridação, em função da razão intensidade Cy3 pela intensidade Cy5 permite identificar genes cuja expressão foi diferencialmente regulada ao longo de metaciclologênese.

A imagem criada foi inicialmente tratada por um programa chamada *Spot* que identifica a área referente a cada sonda e extrai o sinal referente à fluorescência captada para todas as sondas presentes na lâmina. Os dados referentes a todas as hibridações foram normalizados e analisados para o reconhecimento dos genes diferencialmente expressos, através do uso do método estatístico denominado SAM (Significance Analysis of Microarrays) para identificar as variações nas expressões dos genes.

A descrição dos genes selecionados estatisticamente se refere ao projeto da genômica funcional de *Trypanosoma cruzi* (Probst *et al.*, em preparação). Os dados do referido projeto relativo aos genes selecionados da via ubiquitina-proteassomo (Tabelas 1 e 2) foram obtidos e serão apresentados a seguir. A seleção dos genes da via ubiquitina-proteassomo foi baseada em sua anotação, a qual deveria representar um gene com função provável bem estabelecida, e não na identificação de expressão diferencial pelo método SAM.

Alguns dados obtidos pelas análises das sondas que representam os genes da via proteolítica em investigação são apresentados em formatos gráficos para fácil visualização e também agrupados segundo seus padrões diferenciais de expressão. As duas metaciclologêneses, Met16 e Met19, estão dispostas nos gráficos lado a lado a fim de podermos visualizar a concordância ou não no padrão de expressão das duas réplicas biológicas.

Serão apresentados a seguir exemplos dos resultados onde não houve variações entre as duas metaciclologêneses e os genes não sofreram alterações em seu padrão de expressão durante a metaciclologênese. Também mostraremos exemplos de genes que apresentaram diferencialmente expresso ao longo da diferenciação com resultados semelhantes nas duas metaciclologêneses. E um último

grupo que apresenta um padrão de variação mais complexo onde a reprodutibilidade dos padrões de expressão não foi observada nos dois experimentos.

#### **4.3.1 Genes sem variações significativas nas duas metaciclogêneses**

Dentro deste grupo, representados no gráfico 3, foram incluídos os genes de uma ubiquitina carboxi-terminal hidrolase (id: 1047053507053.100), ubiquitina hidrolase (1047053504109.90), subunidades alfa 1 e 2 do proteossomo 20S, subunidade reguladora 7 e 9 não ATPase , e de uma enzima ativadora de ubiquitina (id: 1047053510743.10) Estes resultados apontam que os genes pertencentes a este grupo não são modulados durante a diferenciação.

#### **4.3.2 Genes com variação significativas nas duas metaciclogêneses**

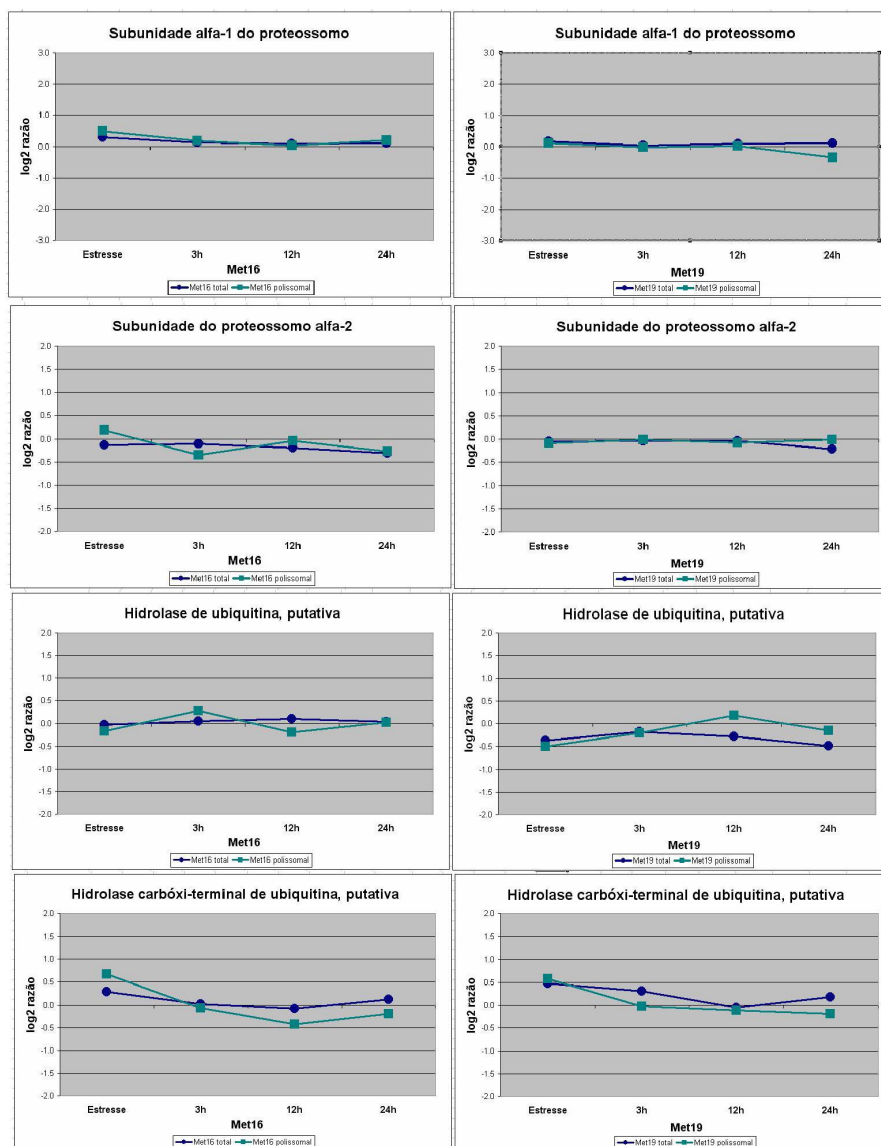
Dentro deste grupo foram incluídos os genes de uma enzima ativadora de ubiquitina (id:1047053508177.100), enzima conjugadora de ubiquitina (id: 10470535011907.270), enzima ligase de ubiquitina, subunidade beta 6 do proteossomo 20S e de uma subunidade alfa 5 do proteossomo 20S.

Estes resultados indicam que os genes pertencentes a este grupo são modulados durante a diferenciação. A busca destes padrões semelhantes pode ser um importante indício de possíveis interações entre eles. Dentro deste grupo também foram observados dois padrões distintos quanto à expressão do RNA total e polissomal. Portanto os genes são apresentados em dois subgrupos:

##### **4.3.2.1. Genes que apresentaram um aumento da expressão na fração de RNA polissomal durante a metaciclogênese**

Esses genes, representados no gráfico 4, tiveram sua expressão aumentada durante a metaciclogênese, isto é, sua razão com relação à fase inicial epimastigota em fase logarítmica de crescimento está aumentada. Estes genes representam funções distintas no sistema estudado.

**Gráfico 3.** Representação gráfica da expressão diferencial durante a metaciclogênese de genes que mantiveram sua expressão inalterada.



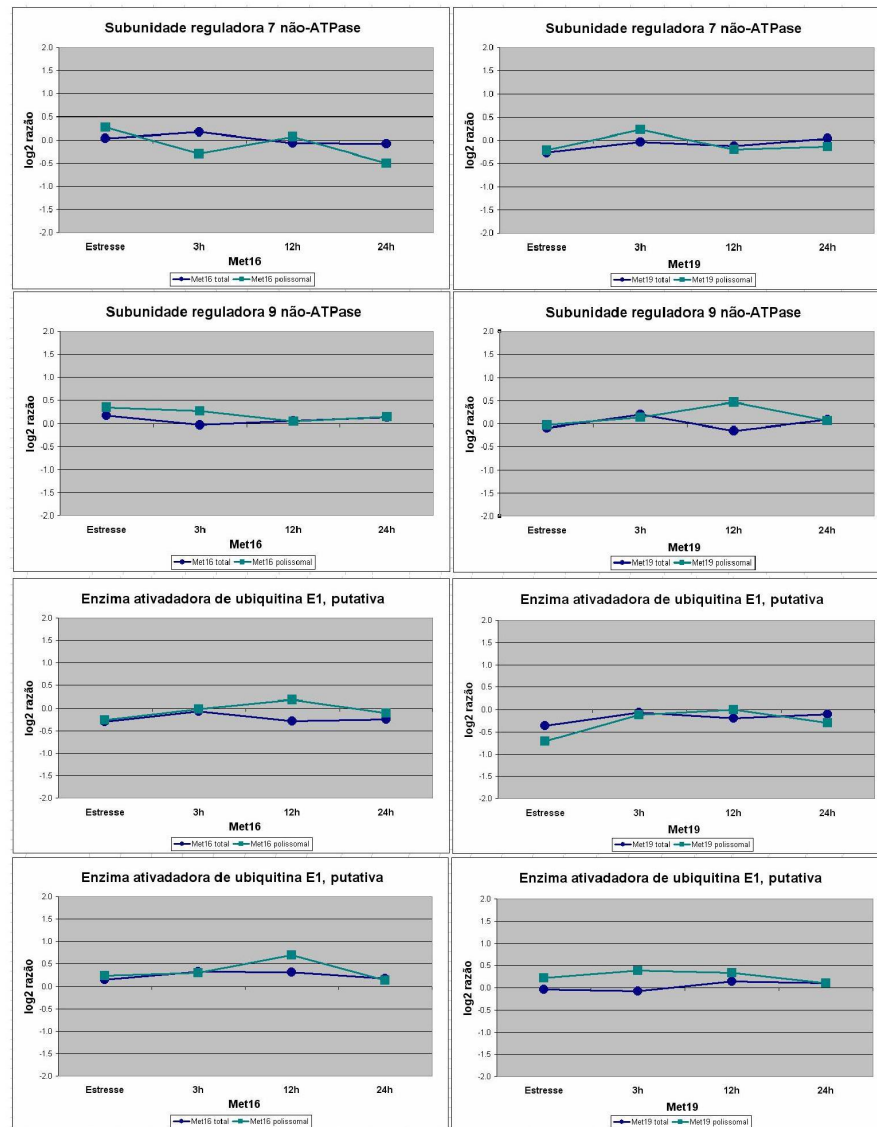
**Met16:** Metaciclogênese Met16.

**Met19:** Metaciclogênese Met19.

**Eixo Y:** logaritmo (base 2) da razão entre a amostra referida no eixo X e epimastigota em fase de crescimento.

**Eixo X:** diferentes estágios evolutivos de *Trypanosoma cruzi* avaliados no processo de metaciclogênese, conforme descrito no texto (seção 4.3).

Gráfico 3. Continuação.



mesmo

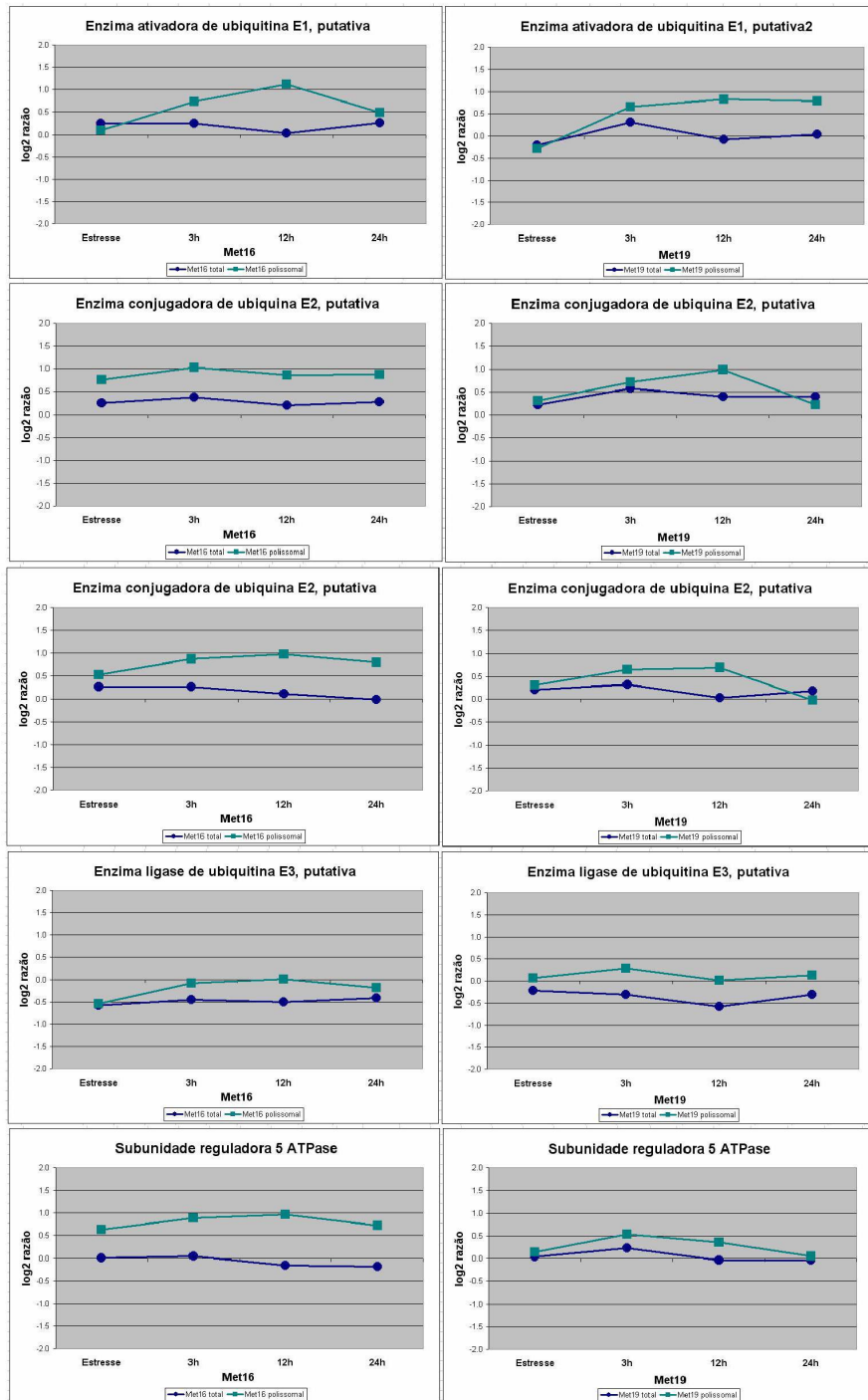
**Met16:** Metaciclologênese Met16.

**Met19:** Metaciclologênese Met19.

**Eixo Y:** logaritmo (base 2) da razão entre a amostra referida no eixo X e epimastigota em fase de crescimento.

**Eixo X:** diferentes estágios evolutivos de *Trypanosoma cruzi* avaliados no processo de metaciclologênese, conforme descrito no texto.

**Gráfico 4.** Representação gráfica da expressão diferencial durante a metaciclo gênese de genes que apresentaram alteração na sua expressão em ambas metaciclo gênese (legenda idêntica à do gráfico 3).

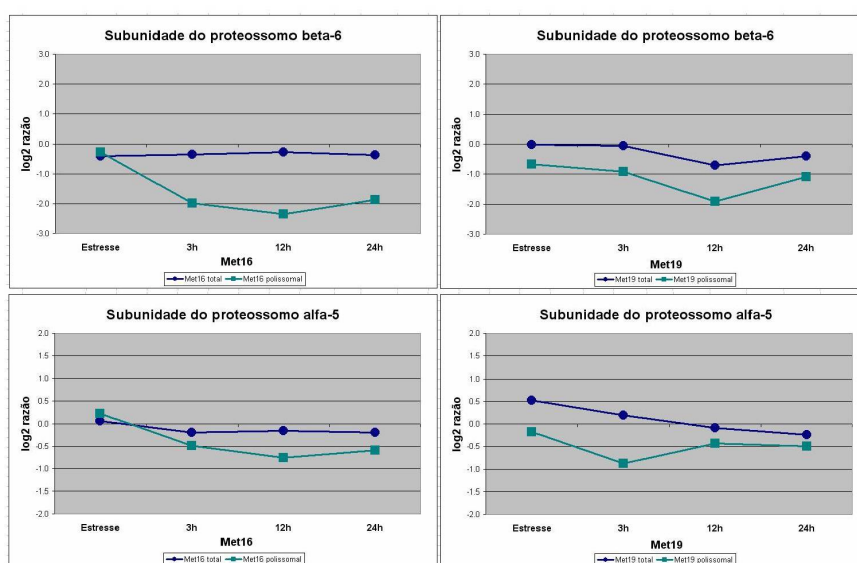


#### 4.3.2.2. Genes que apresentaram uma diminuição da expressão na fração de RNA polissomal durante a metaciclogênese

Esses genes, representados no gráfico 5, tiveram sua expressão diminuída durante a metaciclogênese, isto é, sua razão com relação à fase inicial epimastigota em fase logarítmica de crescimento está diminuída. Da mesma forma que os genes representados no gráfico 4, as diferenças de expressão que são identificadas durante o decorrer da metaciclogênese ocorrem somente no mRNA polissomal. Os níveis de mRNA total permanecem relativamente idênticos aos níveis de mRNA total da forma epimastigota, utilizada como referencial.

Os genes que se apresentaram desmobilizados dos polissomos durante a metaciclogênese fazem parte do proteossomo 20S, as subunidade beta-6 e alfa-5.

**Gráfico 5.** Representação gráfica da expressão diferencial durante a metaciclogênese de genes que apresentaram alteração na sua expressão em ambas metaciclogêneses (legenda idêntica à do gráfico 3).



### 4.3.3 Genes que apresentaram variação significativa em somente uma metaciclologênese

Esses genes, representados no gráfico 6, tiveram sua expressão alterada durante a metaciclologênese, mas somente em uma das replicatas biológicas.

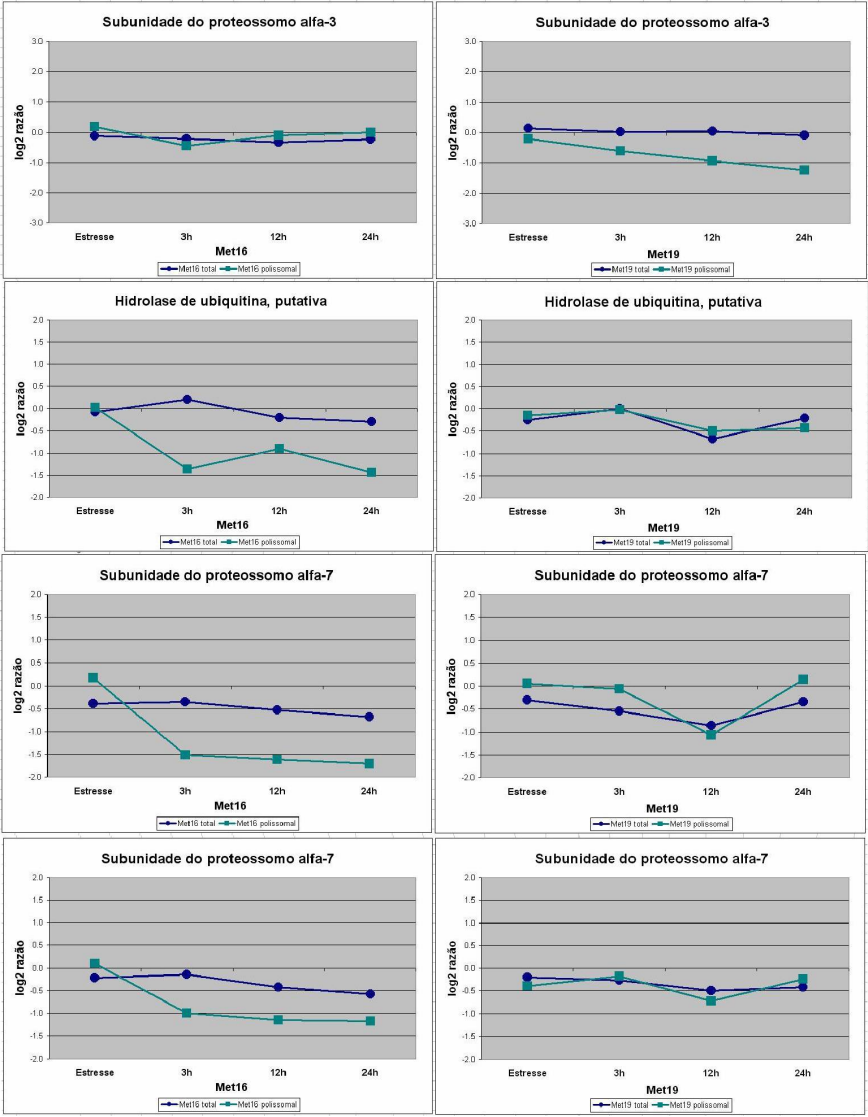
Dentro deste grupo foram incluídos os seguintes genes: subunidade alfa 1, 3 e 7 do proteossomo 20S, subunidade beta 5 do proteossomo 20S, subunidade reguladora não-ATPase 2 e 12, subunidade reguladora 1 ATPase, seis enzimas conjugadoras de ubiquitinas diferentes (id: 1047053511071.71, 1047053503445.20, 1047053511727.40, 1047053506635.90, 1047053509591.10 e 1047053501367.210), duas enzimas ligase de ubiquitina (id: 1047053501367.210, 1047053509053.10), duas ubiquitinas-like (id: 1047053506737.70, 1047053506583.70) e quatros ubiquitinas hidrolases (id: 1047053507507.40, 1047053506445.40, 1047053504131.170 e 1047053505807.270).

Estes dados estão sendo regulados de forma confiável, pois são selecionados através de dois critérios:

- Valor relativo de aumento ou diminuição superior a duas vezes;
- Probabilidade estatística de representar um falso-positivo inferior a 1%, após correção de múltiplos testes, uma necessidade em análises estatísticas de grandes conjuntos de dados, como são os de microarranjo.

No entanto, essa expressão diferencial não foi reproduzível entre os dois experimentos distintos de metaciclologênese. Portanto, sua classificação como genes modulados durante o processo de metaciclologênese deve ser considerada com cautela. Na ausência de análises mais aprofundadas, que estão sendo conduzidas no projeto de Genômica Funcional de *Trypanosoma cruzi*, preferimos classificar esses genes como não apresentando expressão diferencial associada diretamente ao processo de metaciclologênese.

**Gráfico 6.** Representação gráfica da expressão diferencial durante a metaciclôgenese de genes que apresentaram alteração na sua expressão, de forma não reprodutível nas duas metaciclôgeneses (legenda idêntica à do gráfico 3).



mesmo



#### **4.3.4 Agrupamento dos genes da via proteossomo-ubiquitina em relação ao padrão de expressão observado nos experimentos de microarranjos.**

O gráfico 7 mostra de uma maneira geral e resumida o padrão de expressão de todas as sondas dos componentes da via proteossomo-ubiquitina, que foram selecionados pela anotação funcional melhor definida e que continham pelo menos uma sonda no microarranjo.

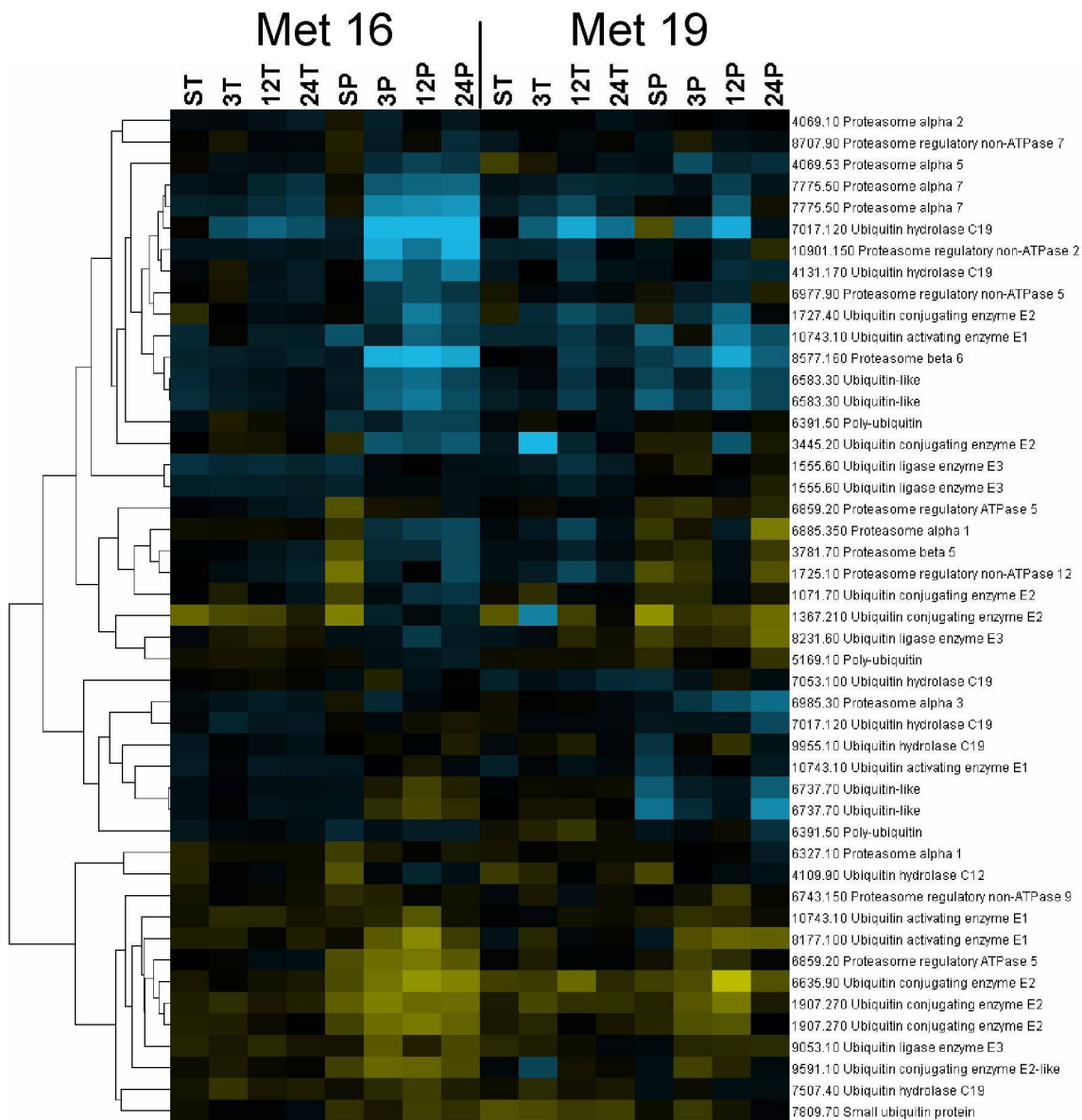
Os genes presentes no gráfico 7 foram organizados através da aplicação da correlação de Pearson aos valores de razão de intensidade das populações estudadas, seguido de uma clusterização hierárquica dos valores de correlação calculados.

O gráfico 7 representa um dendrograma das sondas, dispostas nas linhas. Cada coluna, conforme a explicação da legenda contém a razão da intensidade obtida no microarranjo entre a amostra identificada no topo da coluna e o epimastigota em fase logarítmica de crescimento. Cada célula representa essa razão em uma escala colorimétrica, sendo o aumento e diminuição da razão representado pelas cores amarelo e azul, respectivamente, e as diferentes graduações, do mais escuro ao mais claro, representam a intensidade relativa.

Ao lado de cada linha encontra-se o nome do gene correspondente a cada sonda, de modo que podemos acompanhar seu perfil de expressão ao longo da diferenciação, visualizando o RNA total e polissomal nas duas metaciclogêneses (Met16 e Met19).

Neste gráfico as sondas foram agrupadas de acordo com seus perfis de expressão comum, a fim de fornecer uma visão geral dos genes que apresentam padrões de expressão semelhantes. Estes grupos estão indicados pelas linhas traçadas à esquerda de acordo com a proximidade do valor das intensidades.

Gráfico 7: Clusterização dos componentes da via proteossomo-ubiquitina



Legenda:

**Met16:** Metaciclógênese Met16.

**Met19:** Metaciclógênese Met19.

**Código das colunas:** amostras de acordo com a nomenclatura descrita na seção

4.3, associado ao mRNA utilizado (T=total, P=polissomal).

## 5. DISCUSSÃO

Em tripanossomas, o controle do mecanismo da expressão gênica é feito em sua maioria a nível pós-transcricional ou pós-traducional (Elias, 2001). Estes parasitas necessitam adaptar-se rapidamente às transições entre o inseto vetor e o hospedeiro mamífero fazendo uma reprogramação na expressão de seus genes. Durante este processo muitas alterações podem estar associadas à seleção e degradação de proteínas estágio-específicas.

Em células eucarióticas, a degradação de proteínas intracelulares é mediada principalmente pela via ubiquitina-proteossomo. Esta via proteolítica controla várias funções celulares incluindo a progressão do ciclo celular, transcrição estágio-específica, processos antigênicos e controle de qualidade das proteínas (revisto por Pickart, 2004).

A participação da ubiquitina na via de degradação de proteínas pelo proteossomo em *T. cruzi* foi proposta por estudos que mostraram um grande aumento nos níveis de proteínas ubiquitinadas quando tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas. Além disso, o genoma do *T. cruzi* possui mais de 100 seqüências que codificam para ubiquitinas, um número muito maior que em outros organismos (Swindle e cols, 1988).

Estudos com um inibidor de proteossomo chamado lactisistina demonstraram o bloqueio da diferenciação intracelular de amastigotas para tripomastigotas. Entretanto, a falta de efeito da lactisistina em tripomastigotas intracelulares em cultura de mioblastos sugere que a atividade do proteossomo não é requerida para a invasão da célula hospedeira (De Diego e cols, 2001).

Apesar destes estudos, pouco se sabe a respeito do envolvimento do proteossomo nas diversas funções biológicas do *T. cruzi* em seus diferentes estágios evolutivos, sobre os componentes que atuam neste complexo sistema proteolítico e qual sua participação durante os processos de diferenciação celular do parasita.

Com o propósito de avaliar mais sistematicamente esta via em *T. cruzi*, quais os componentes do proteossomo que nela atuam e como estes se comportam durante o início da metaciclogênese, utilizamos nesse trabalho uma ferramenta da genômica funcional conhecida como microarranjo de DNA.

O microarranjo utilizado nesse trabalho foi confeccionado inteiramente no Instituto de Biologia Molecular do Paraná por nossa equipe. Para avaliar a cobertura do nosso microarranjo quanto à via proteossomo-ubiquitina, realizamos uma busca no banco de dados de *T. cruzi* no site GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/tcruzi/>) através de duas palavras chaves: “ubiquitin” e “proteasome”.

O resultado da pesquisa revelou uma cobertura de 45% para os genes da via proteossomo-ubiquitina, sendo que para os genes do proteossomo 26S a representatividade foi de 55% e para os genes da família das ubiquitinas foi de 41%.

Para o proteossomo 26S foram encontrados 89 genes anotados sendo que 49 deles estão presentes no microarranjo.

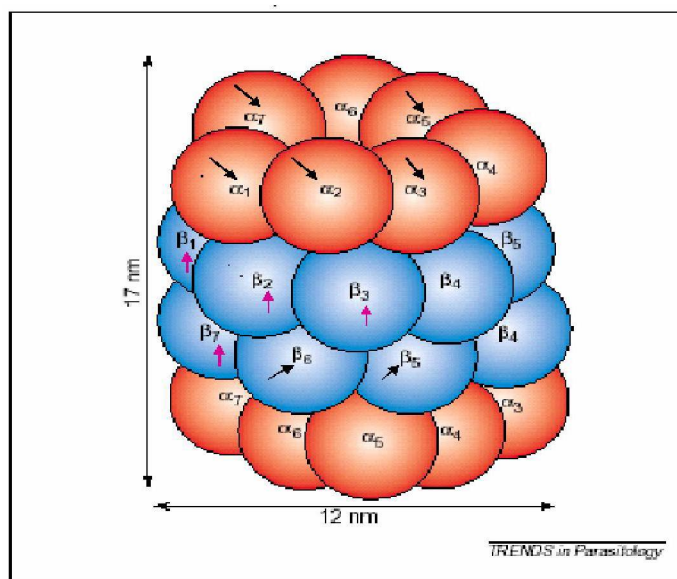
O proteossomo 26S de epimastigotas de *T. cruzi* foi identificado como um complexo com peso molecular de 1.400 kDa com uma composição semelhante a dos proteossomos de células eucarióticas (1.500 kDa) (De Diego e cols, 2001; Goldberg, 1992).

Todavia, ainda resta esclarecer quais são os componentes, tanto do núcleo catalítico 20S quanto da subunidade reguladora 19S do *T. cruzi* e averiguar se existem diferenças importantes em relação ao proteossomo das células eucarióticas.

Dentre as subunidades para o proteossomo 20S, foram encontradas anotadas em *T. cruzi* cinco subunidades alfas (alfa 1,2,3,5 e 7) sendo que todas estão representadas no microarranjo e seis subunidades beta (beta 1,2,3,5,6 e 7) das quais as subunidades beta 5 e 6 estão representadas no microarranjo.

Abaixo, uma representação esquemática deste complexo onde todas as flechas indicam as subunidades anotadas no genoma de *T. cruzi* e as flechas pretas as subunidades representadas no microarranjo.

**Figura 8.** Representação esquemática da composição da subunidade 20S do proteossomo (subunidades alfas e betas), com os elementos presentes no microarranjo identificados por flechas escuras.

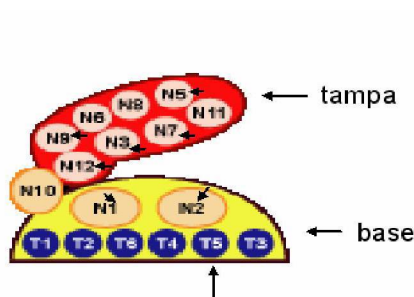


Observa-se que a representatividade no microarranjo para as subunidades alfas é bem maior que para as subunidades betas. Atualmente, um microarranjo contendo uma cobertura completa do genoma de *T. cruzi* está sendo feito e a expressão relativa dessas outras proteínas poderá ser avaliada.

Para a subunidade reguladora 19S, a pesquisa no banco de dados de *T. cruzi* revelou a presença de cinco subunidades reguladora ATPase (Rpt1, 2, 3, 5 e 6) e duas não-ATPase (Rpn1 e 2), que compõem a base do 19S. Somente as subunidades Rpt5, Rpn1 e Rpn2 estão representadas no microarranjo.

Quanto aos componentes da “tampa” do 19S foram encontradas anotadas no banco de dados dez subunidade reguladoras não-ATPase (Rpn3, 5, 6, 7, 8, 9, 11 e 12) sendo que as subunidade Rpn3, 5, 7, 9 e 12 estão representadas no microarranjo. Segue abaixo uma representação esquemática deste complexo onde as flechas pretas representam todas as subunidades presentes no microarranjo.

**Figura 9.** Representação esquemática da composição da subunidade 19S do proteossomo - N (Rpn – Subunidades reguladoras não-ATPases), T (Rpt - subunidades reguladoras ATPses) - com os elementos presentes no microarranjo identificados por flechas escuras.



O fato de não haver anotação para algumas das subunidades tanto do 20S quanto do 19S pode indicar que a composição do proteossomo de *T. cruzi* possivelmente apresente algumas particularidades que podem estar relacionadas a subunidades diferentes ou estas simplesmente ainda não foram descritas pois apresentam uma divergência significativa em relação as descritas em outros organismos.

Para os genes da família das ubiquitinas a representatividade foi de 41%. Foram encontrados 143 genes anotados, dentre estes 57 estão representados no microarranjo. Dentro deste grupo se encontram as enzimas envolvidas com o mecanismo de ubiquitinação. Para o grupo de enzimas ativadoras de ubiquitinas, E1, dos 7 genes anotados 2 deles estão representados no microarranjo. Para as enzimas conjugadoras de ubiquitinas, E2, foram encontradas 13 genes anotados sendo que 7 deles estão representados no microarranjo e para as enzimas ligases, E3, dos 4 genes anotados 3 deles estão representados no microarranjo.

Em eucariotos existem mais E2s do que E1s e mais E3s do que E2s, a cada passo, o número de proteínas que potencialmente estão envolvidas aumenta, bem como a especificidade de ligação com o próximo componente. A E3 sozinha ou em combinação com E2 é quem determina o reconhecimento do substrato (Joazeiro e Weissman, 2000). Todavia neste trabalho encontramos um número maior de E2s do

que E3 este fato potencialmente pode indicar uma complexidade diferente deste sistema no *T. cruzi*.

As enzimas desubiquitinadoras também participam da via pela remoção de ubiquitinas dos substratos ou na clivagem dos precursores de ubiquitinas. Para esta família de enzimas foram encontrados 13 genes anotados do genoma de *T. cruzi* sendo que seis deles estão representados no microarranjo. Também foram encontradas duas ubiquitinas-like representadas no microarranjo.

A cobertura do microarranjo para os genes do sistema ubiquitina-proteossomo é de 45% sendo que muitos genes anotados representam proteínas hipotéticas com domínios de proteossomo ou ubiquitina que podem estar atuando direta ou indiretamente na via. Estudos adicionais ainda são necessários para a confirmação desta função biológica anotada e para o esclarecimento de suas funções. De qualquer forma, esses genes estão sendo acrescentados ao microarranjo de *T. cruzi*, mesmo sem terem anotação funcional no presente momento. Isso poderá ajudar a elucidar se sua função está relacionada realmente às ubiquitinas.

As hibridações realizadas no microarranjo foram referentes aos primeiros momentos da diferenciação celular, parasitas na forma de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Ep), epimastigotas após 2 horas de estresse nutricional (St), epimastigotas aderidos há 3 horas (3h), 12 horas (12h) e 24 horas (24h) utilizando RNA total (T) e polissomal (P) de duas metaciclogêneses distintas.

Estes estágios evolutivos foram escolhidos para avaliarmos o início da metaciclogênese *in vitro* do *T. cruzi*, pois durante estes tempos os epimastigotas aderem-se ao substrato antes de diferenciarem-se em tripomastigotas metacíclicos e provavelmente durante esta adesão ocorra uma reprogramação da expressão gênica associada às mudanças morfológicas e fisiológicas relacionadas ao processo de diferenciação celular. A tecnologia de microarranjo é utilizada aqui para avaliar quais genes da via proteolítica ubiquitina-proteossomo tiveram sua expressão modulada ao longo do ciclo evolutivo. Futuramente novos pontos intermediários serão também avaliados com o propósito de aumentar a possibilidade de avaliar variações na expressão gênica que ocorrem em tempos menores.

A utilização de RNA total e RNA polissomal fornece uma visão da dinâmica da expressão relativa dos genes que estão sendo expressos em uma fração ou na outra. Essa visão relativa nos possibilita investigar mecanismos relacionados à

regulação pós-transcricional e inferir sobre o que pode estar ocorrendo com os genes associados ao polissomo bem como os genes que estão no RNA total, pois é uma questão em aberto, ainda, quais são os mecanismos de regulação da expressão gênica existentes em *Trypanosoma cruzi* e proporção de suas contribuições relativas. O mecanismo de associação do mRNA aos polissomas vem sendo investigado há cerca de quatro anos por nossa equipe.

Existem evidências que o controle da mobilização polissomal é um importante mecanismo na regulação pós-transcricional (Ávila e cols, 2001; Dallagiovanna e cols, 2001; Fragoso e cols, 2003). Este mecanismo provavelmente está associado a seqüências nas regiões não traduzidas dos RNAs (UTRs).

Para investigar a expressão gênica da via ubiquitina-proteossomo analisamos amostras de RNA total e polissomal separadamente o que forneceu uma visão relativa das expressões dos genes nas duas frações.

As análises do microarranjo revelaram os padrões de expressão de vários componentes da via proteossomo-ubiquitina.

Entre as duas metaciclogêneses distintas (Met16 e Met19), que representam réplicas biológicas distintas do processo, o padrão de muitos genes foi confirmado sendo que estes dados foram considerados consistentes.

Exemplos da concordância dos resultados nas duas metaciclogênese (Met16 e Met19) podem ser observados no grupo 4.3.1 dos resultados, onde os genes mantiveram-se constantes sem variações significativas (menor que duas vezes nos dois experimentos) e com boa reprodutibilidade biológica.

Um segundo grupo de genes (resultado 4.3.2) apresentou variações significativas durante a diferenciação apresentando padrão semelhante nas duas metaciclogênese. A concordância do perfil nas duas metaciclogêneses reforça a consistência biológica da regulação desses genes provavelmente relacionada com eventos ocorridos na metaciclogênese. Corroborando estes dados, genes que possuem duas sondas no microarranjo apresentaram padrões muito semelhantes. Isto aumenta a confiabilidade dos dados apresentados. Além disso, essas expressões diferenciais foram identificadas somente no mRNA polissomal.

Este grupo foi dividido em subgrupos. O subgrupo 4.3.2.1 apresentou um aumento relativo da expressão dos genes no mRNA polissomal, ao longo da metaciclogênese, indicando a existência de um possível mecanismo de mobilização



polissomal. O outro grupo de genes descritos no item 4.3.2.2 é constituído de genes que apresentaram uma diminuição relativa da expressão gênica no mRNA polissomal, ao longo da metaciclologênese, representando uma desmobilização polissomal.

O terceiro grupo de genes (resultado 4.3.3) apresentou um padrão que não foi mantido entre as duas metaciclologêneses. Estes genes possuem padrões complexos e provavelmente estão sendo regulados de uma maneira não-dependente da metaciclologênese, ou seja, podem estar respondendo diferentemente a outros sinais biológicos presentes nas preparações das culturas.

A variabilidade técnica nos diferentes passos na confecção do microarranjo ou degradação do RNA são geralmente causas de discordância entre réplicas biológicas do mesmo experimento. No entanto, o padrão identificado para os genes descritos na secção 4.3.3 não apóia tal tipo de causa, pois há uma grande concordância intra-experimental. Esse fato reforça a idéia de complexidade biológica, e não técnica, desses padrões.

Novos experimentos de metaciclologênese são necessários para a elucidação dessa discrepância entre os dois experimentos de metaciclologênese aqui estudados. Uma análise dos genes que compartilham esses padrões também pode ajudar a identificar as possíveis causas para o resultado obtido.

Este grupo foi o que apresentou um maior número de componentes indicando que a maioria dos genes da via em estudo seja regulada de forma independente da metaciclologênese estando associada a outros fenômenos biológicos.

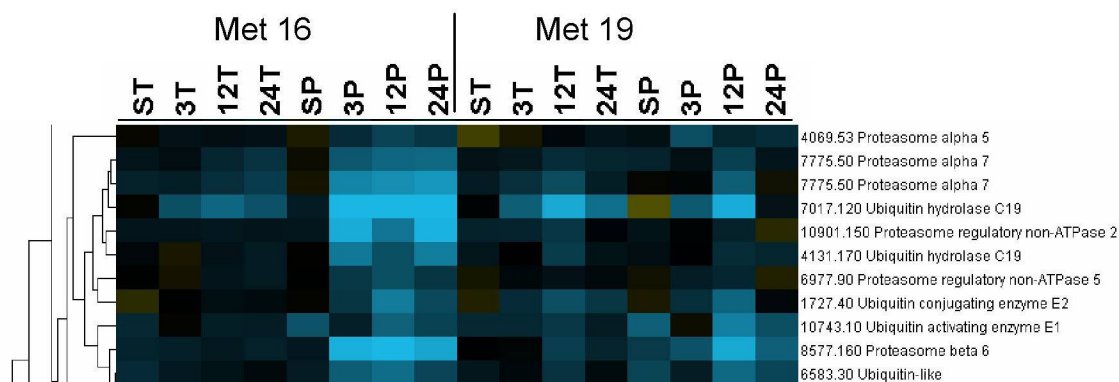
Todos os componentes presentes no microarranjo foram agrupados por padrões de expressões comuns. Esta organização foi feita com intuito de resumir os dados e fornecer uma visão mais ampla dos genes quanto aos seus padrões.

Alguns grupos apresentaram maior consistência, com padrões de expressão muito similares, indicando informações biológicas importantes a respeito da dinâmica de interação desses genes entre si durante a metaciclologênese.

O bloco que apresentou um número consistente de genes no gráfico de clusterização geral agrupou as subunidades alfa 5 e alfa 7 do proteossomo 20S, duas ubiquitinas hidrolases, subunidades reguladoras 2 e 5 não-ATPases, uma enzima ativadora de ubiquitina, uma enzima ligase e uma subunidade beta 6 do proteossomo. Apesar de alguns genes não apresentarem o mesmo padrão nas

réplicas biológicas a similaridade dos padrões de expressão intra experimento em Met16 foi consistente.

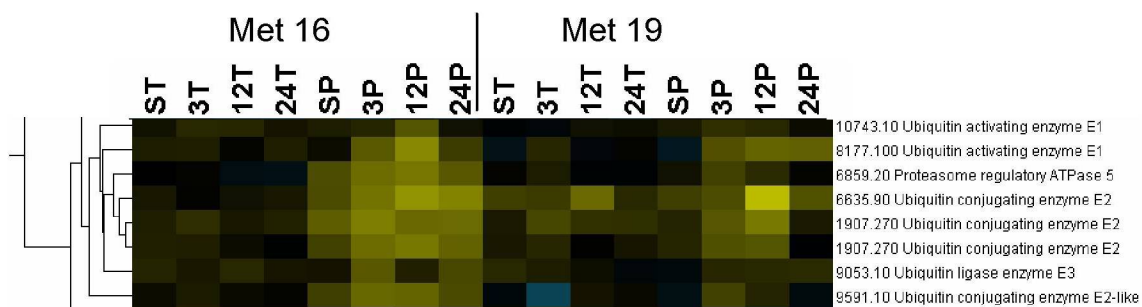
O cluster a seguir fornece uma imagem dos padrões dos genes agrupados.



Estes genes apresentaram um perfil de expressão comum e de uma maneira geral houve uma diminuição na expressão nos parasitas aderidos (3, 12 e 24 horas de diferenciação) do experimento Met16, indicando que este grupo pode ter sua expressão regulada de maneira coordenada durante a metaciclização. O gene da subunidade alfa-5 do proteassomo não apresentou expressão diferencial e sua relação com o grupo é muito distante, conforme pode ser visto pelo dendrograma à esquerda da figura. É tentador afirmar que esses genes, que apresentam um perfil regulatório idêntico em Met16, podem estar interagindo funcionalmente de forma próxima. Novos experimentos envolvendo a análise do transcriptoma de *T. cruzi* são necessários para comprovar estes indícios de interação entre estas proteínas, pois o agrupamento conjunto de genes visando a identificação de redes gênicas funcionais, no processo denominado de “culpado por vizinhança (*guilty by neighborhood*), necessita de uma representação ampla e complexa do transcriptoma.

Outro grupo consistente está representado no cluster a seguir. Foram agrupados neste cluster uma enzima ativadora de ubiquitina (E1), duas diferentes enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2), uma enzima conjugadora de ubiquitina like (E2-like), uma enzima ligase (E3) e uma subunidade reguladora 2 ATPse. A

possibilidade de interação das enzimas E1, E2, e E3 presentes nesse cluster será avaliada por ensaios de ubiquitinação *in vitro*.



Este grupo apresentou um aumento na expressão no RNA polissomal o que abre novas perspectivas para investigação de possíveis mecanismos de regulação pós-transcricional por controle da mobilização polissomal. O padrão de expressão foi mantido, de forma geral, nas réplicas biológicas o que aumenta a consistência destes dados.

Os dados obtidos nesse trabalho avaliaram a expressão de vários membros da via de degradação de proteínas ubiquitina-proteossomo em *T. cruzi*, sendo estes possivelmente coordenados por uma série de eventos regulatórios, associada a necessidades biológicas e adaptativas do parasita durante o processo da metacicloênese, demonstrando uma regulação complexa de sua expressão.

Alguns genes apresentaram um perfil de expressão com poucas variações o que indica que estes não foram fortemente regulados durante a metacicloênese. No entanto, muitos outros genes apresentaram-se diferencialmente expressos, até mesmo os genes das subunidades estruturais do proteossomo 19S e 20S. Estes dados sugerem que os componentes estruturais podem estar interagindo de forma dinâmica nesta via proteolítica ou até mesmo podem estar ocorrendo a atuação mais intensa de algumas subunidades nos diferentes estágios evolutivos.

Os dados obtidos sobre estes padrões de expressão abrem novas perspectivas de investigação para possíveis mecanismos de regulação e interação entre estes componentes da via.

O conjunto de informações aqui obtidas sobre a via metabólica ubiquitina-proteossomo permitirá ampliar nosso entendimento dos mecanismos de regulação envolvidos na degradação de proteínas bem como identificar os componentes participantes, além de suas funções. A investigação dos genes diferencialmente expressos ampliará nosso entendimento a respeito desse complexo sistema.

Como propósitos para continuação desse trabalho, já selecionamos alguns componentes da via por padrões de expressão no microarranjo e iniciaremos suas caracterizações funcionais.

A utilização da ferramenta de RNA de interferência para a elucidação da função do gene em vários sistemas vem se mostrando muito eficiente nos últimos anos. O RNA de interferência é um processo no qual a introdução de um RNA dupla fita em um célula, causa a degradação específica do mRNA endógeno correspondente. Este efeito parece ser dependente de um mecanismo de hibridação entre o RNA exógeno e o mRNA endógeno, levando assim, a anulação da função do gene (revisto por Bass, 2000). Evidências sugerem que o efeito de interferência ocorre a nível pós-transcricional (Montgomery e cols, 1998). Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso em estudos em *T. brucei*. Entretanto o *T. cruzi* não apresenta a maquinaria protéica necessária para a produção de miRNAs e não foi possível produzir interferência de RNA (Ullu, 2004). Portanto é necessário buscar alternativas de investigação.

As técnicas de transformação de *T. cruzi* evoluíram muito nos últimos anos, uma vez que permitiram analisar de uma maneira eficiente a função gênica e os mecanismos de regulação de sua expressão. Atualmente já é possível inserir plasmídeos carregando marcadores genéticos (genes codificando resistência a antibióticos tais como neomicina e higromicina, entre outros), flanqueados por seqüências pertencentes ao locus cromossômico de interesse, de maneira que através do processo de recombinação homóloga o marcador de resistência possa substituir o gene de interesse. A substituição de todos os alelos gênicos pelos marcadores de seleção leva à geração de um mutante nulo, no qual a perda da função gênica específica poderá ser analisada quanto a sua relevância no ciclo de vida do parasita (Lu e Buck, 1991).

Um outro aspecto de grande interesse na investigação dessa via é a identificação dos alvos que irão para degradação. Assim saberemos quais os alvos

indispensáveis ou responsáveis pelo mecanismo de diferenciação celular do *T. cruzi*. O primeiro passo será a realização da ubiquitinação *in vitro* e a identificação das enzimas envolvidas na marcação dos alvos para a degradação.

Para analisar a via proteolítica quanto às interações dos componentes e para a identificação dos alvos utilizaremos um sistema de co-expressão para múltiplas proteínas em *E. coli*. Nesse sistema é possível utilizar um único plasmídeo que carrega dois ou mais genes ou múltiplos plasmídeos contendo origens de replicação compatíveis e genes de resistência a drogas que permitem que estes coexistam de forma estável na mesma célula e co-expressem até quatro proteínas alvos. Para identificação de alvos utilizaremos um dos plasmídeos para expressar bibliotecas de cDNA das diferentes fases evolutivas do *T. cruzi*.

Ensaio de interação de proteínas (tipo duplo híbrido) também representam uma opção para investigação das inter-relações entre os componentes que apresentaram padrões de expressão similar no microarranjo e serão avaliados para a melhor caracterização da interação entre os membros desta via.

## 6. CONCLUSÕES

- A presença de muitos componentes que participam da via de degradação de proteínas ubiquitina-proteossomo identificados no genoma do *T. cruzi* indicam um possível papel desta via na regulação da expressão protéica do parasita.
- Não foram observadas grandes mudanças na expressão dos genes envolvidos nesse sistema, no entanto as mudanças com significância estatística revelaram que os genes dessa via sofrem uma regulação complexa de sua expressão.
- Alguns componentes apresentam perfis comuns de expressão o que abre novas perspectivas para investigação de possíveis interações entre eles.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila A.R; Yamada-Ogatta S.F; da Silva Monteiro V; Krieger M.A. Nakamura C.V; De Souza W; Goldenberg S. (2001). Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically, expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol*, 117(2): 169-170.
- Aymerich S; Goldenberg S (1989). The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. *Exp Parasitol* 69:107-115.
- Baptista C. S; Vencio R. Z; Abdala S; Valadares M. P; Martins C; de Braganca Pereira C. A; Zingales B (2004). DNA microarrays for comparative genomics and analysis of gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Biochemical Parasitology* 138: 184-194.
- Bartholomeu D (2001). Molecular cloning and carachterisation of a gene encoding the 29-KDa peoteasome subunit from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Genetics Genomics* 265: 986-992.
- Bass B (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 103.
- Belli S (2000). Chromatin remodeling during the life cycle of trypanosomatids. *Int J Parasitol* 30:679-687.
- Bonaldo M. C; Souto-Padron T; De Souza W; and Goldenberg S. (1988). Cell - substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Journal of Cell Biology* 106, 1349-1358.
- Bowtell D; Sambrook J. (2002) DNA microarrays a molecular cloning manual. Editora Library of Congress, p 236- 254.
- Brener Z; Andrade Z. (eds.) (1979). *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Editora Guanabara Koogan, p 1-41.

- Brown P; Botstein D (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature genetics* suppl 21:33-37.
- Carpenter A. E; Sabatini D. M (2004). Systematic genome-wide screens of gene function. *Nature Reviews* 5: 11-22
- Cano M. I; Gruber A; Vásquez M; Cortés A; Levin M. J; Gonzáles A; Degrave W; Rondinelli E; Zingales B; Ramirez J. L; Alonso C; Requena J. M; Franco da Silveira J (1995). Molecular karyotype of clone CL Brener clones for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol* 71: 273-278
- Cheung V. G; Spielman R. S (2002.) The genetics of variation in gene expression. *Nature Genetics* (suppl) 32.
- Cheung V. G; Morley M; Aguilar F; Massimi A; Kucherlapati R; Childs G (1999). Making and reading microarrays. *Nature Genetics* (suppl) 21: 15-19.
- CHIEFFI P; AMATO N. V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2000.
- Chung C; Baeks S (1998). Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochemical biophysics. Res. Commun* 266:633-640.
- Contreras V. T; Araujo-Jorge T. C; Bonaldo M. C; Thomas N; Barbosa H. S; Meirelles M. N; Goldenberg S. (1988). Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 83, 123-133.
- Contreras V. T; Salles J. M; Thomas N; Morel C. M; Goldenberg S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology* 16, 315-327.
- Clayton C. E (1999). Genetic manipulation of Kinetoplastida. *Parasitol Today* 15:372-378.



- Clayton C. E; Fueri J. P; Itzhaki J. E; Bellofatto V; Sherman D. R; Wisdom G.S; Vijayasarathy S; Mowatt M. R (1990). Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 10: 3036-3047.
- Dallagiovanna B; Plazanet-Menut C; Ogatta S. F; Ávila A.R; Krieger M. A; Goldenberg S. (2001). *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitinbinding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. *Exp. Parasitol.*, 99(1):7-16.
- Dallagiovanna B; Gamarro F; Castanys S (1996). Molecular characterization of a P-glycoprotein-related *tcpgp2* gene in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 75: 145-157.
- Davis R. E (1996). Spliced leader RNA Trans-splicing in Metazoa. *Parasitol Today* 12(1): 33-40.
- De Diego; Juana L; Katz J. M; Marshall P; Gutiérrez B; Manning J. E; Nussenzweig V; Gonzalez J. (2000). The ubiquitin-Proteasome pathway an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry*. 40: 1053-1062.
- De Souza W. (1984). Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology* 86, 197-283.
- Dias J.C.P (2000). Epidemiologia. Em: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. Zigman Brener, Zilton Andrade e Manoel Barral-Neto ed. Guanabara Koogan.
- Dias J.C.P; Coura J.R. (1997). Epidemiologia. Em: Dias, J.C.P., Coura, J.R. (eds.). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ Editora, pp33-36.
- Dvorak J. A; Hall T.E; Crane M.S.T; Engel J. C; McDaniel J.P; Uriegas R (1982). *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J Protozool* 29(30): 430-437

- Duncan R.C; Salotra P; Goyal N; Akopyants N. S; Beverley S. M; Nakhasi H (2004). The application of gene expression microarray technology to kinetoplastid research. *Molecular Medical* 6:611-621.
- Duggan D.J; Bittner M; Chen Y; Meltzer P; Trent J. (1999). Expression Profiling using cDNA array. *Nature Genetics*, 21:10-14.
- Eisen M. B; Spellman P. T; Brown P. O; Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(25): 14863-68.
- Elias M.C; Marques-Porto R; Freymüller E; Schenckman S (2001). Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation *Mol Biochem Parasitol* 112: 79-90.
- Elsasser S; Gali R; Schwickart M; Larsen C; Leggett D. S; Muller B; Feng M, T;Tubing F; Dittmar G; Finley D. (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nature Cell Biology* .4:725-730.
- Finley D; Ciechanover A (1984) Thermobility of ubiquitin-activating enzyme, E1, is cell-cycle-dependent. *Biochemical journal* 300:701-708.
- Forratini O. P. (1980) Biogeografia, origem edistribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *REv S Públ*, 14: 285-299
- Fragoso S.P; Mattei D; Hines J.C; Ray D; Goldenberg S (1998). Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. *Mol Biochem Parasitol* 94: 197-204.
- Fragoso S.P; Plazanet-Menut C; Carreira M.A; Motta M.C; Dallagiovanna B; Krieger M.A; Goldenberg S (2003). Cloning and characterization of a gene a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*.
- Furger A; Schürch N; Kurath U; Roditti I. (1997). Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei*

by modulation RNA stability and translation. *Molecular and cellular Biology* 17, 4372-4380

- Garcia E. S; Gonzalez M. S; De Azambuja P; Baralle F. E; Fraidenraich D; Torres H. N; Flawia M. M. (1995). Induction of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in the gut of the hematophagous insect vector, *Rhodnius prolixus*, by hemoglobin and peptides carrying alpha D-globin sequences. *Experimental Parasitology* 81, 255-61.
- Gilinger G; Bellofatto V (2001). Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res* 29(7): 1556-1564
- Glickman, M (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related thr COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94:615-623.
- Goldenberg, S; Salles, J.M.; Contreras, V.T.; Lima Franco, M.P.A.; Katzin, A.M.; Colli, W. e Morel, C. (1985). Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS*, 180(2): 265-270.
- Goldenberg, S; Contreras, V.T.; Bonaldo, M.C.; Salles, J.M.; Lima Franco, M.P.A.; Lafaille, J.; Gonzales-Pedromo, M.; Linss, J. & Morel, C.M. (1987). *In vitro* differentiation systems for the study of differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. In: *Molecular Strategies of Parasitic Invasion*, p. 203-212.
- Goldenberg S; Contreras V.T; Salles J. M; Bonaldo M. C; Lima F. M; Linss J; Lafaille J; Valle D; Morel C.M (1984). Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 39-44.
- Goldeberg A; Rock K (1992). Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357: 375-9.

- Goldenberg S (1991). Gene Expression during development of *Trypanosoma cruzi*., C. C. Wang, ed. (Washington, DC: American Association for the Advancement of Science).
- Goldenberg S (1990). *Trypanosoma cruzi* as a model system for studying cell differentiation. *Parasites: Molecular Biology, Drug and Vaccine Design*: 1-6.
- Gonen H (1999) Identification of the ubiquitin carrier proteins, E2, involved in signal-induced conjugation and subsequent degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *Journal Biology Chemistry* 274: 14823-30.
- Gonzalez J; Ramalho-Pinto F.J; Frevert U (1996) Proteasome activity for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. *J Exp Med* .184: 1900-18
- Guimarães A.C (1997). *Cardiopatia Crônica: Insuficiência cardíaca*. Em: Dias, J.C.P., coura, J.R. (eds.). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora.
- Hecker H; Betschart B; Bender K; Burri M; Schlimme W (1994). The chromatin of trypanosomes. *Int J Parasitol* 24(6): 809-819.
- Hehl A; Vassella E; Braun R; Roditi I, (1994). A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl acad Sci USA* 91: 370-374.
- Henriksson J; Aslund L; Pettersson U (1996). Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 12(3): 108-114.503-533.
- Hershko A; Ciechanover A (2001) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochemical* 70:
- Hochstrasser M (2000). All in the ubiquitin family. *Science*. 289: 563-564.
- Hotz H. R; Lorenz P; Fischer R; Krieger S; Clayton C. (1995). Role of 3'-untranslated regions in the regulation of hexose transporter mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 75, 1-14.

- Huang J; Van der Ploeg L.H (1991). Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor EMBO J 10(12): 3877-3885
- Huang X; Madan A. (1999). CAP3: a DNA sequence assembly program. Genome Res., 9: 868-877.
- Huang L (1999). Structure of an E6AP-Ubc7H complex: insights into ubiquitination by the E3-E2 enzyme cascade. Science 286:1321-26.
- Johnson P. J; Kooter J. M; Borst P(1987). Inactivation of transcription by UV radiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. Cell 51: 273-281
- Jones D; Crowe E; Stevens T. A; Candodo P. E (2001). Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. Genome Biology. 3:201-211.
- Kohane, I.S.; Kho, A., Butte, A.J. (2002). Microarrays for an integrative genomics. The MIT Press,
- Krieger M.A; Ávila A.R; Ogatta S.F; Plazanet-Menut C; Goldenberg S. (1999) Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis. Mem.Inst.Oswaldo.Cruz 94 supl 1: 165-168
- Krieger M. A; Goldenberg S. (1998). Representation of differential expression (RDE): A new approach to study differential gene expression in trypanosomatids. Parasitology Today 14,163-166.
- Lander E (1999). Array of hope. Nature genetics supp 21:3-4.
- LeBowitz J.H; Smith H.Q; Rusche L; Beverley S. M (1993). Coupling of Poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. Gene Develop 7: 996-1007.

- Lee R. C; Ambros V (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864
- Liang P; Pardee A. B (2001). Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971
- Li Ziyin ; Wang C (2002). Functional chracterization of the 11 non-ATPase subunit pretein in the trypanosome 19S proteosomal regulatory complex. *The journal of biological chemistry* 45:686-692.
- Lu, H.; Buck, G (1991). Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 44(1), p. 109-14,.
- Madura K (2004). Rad 23 and Rpn10: perennial wallflowers join the m  lee. *TRENDS in Biochemical Sciences* 29:637-640.
- Matkin A; Das A; Vivian B (2001).The leptomonas seymouri splice leader RNA ptomoter requires a novel transcription factor.*Int J Parasitol* 31:545-549.
- Moffet L. K; Stefan H; Kenneth D.S (1997). RNA editing: getting U into RNA. *TIBS* 22: 162-166.
- Montgomery, M.K.; Xu, S; Fire, A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Carnorhabitidis elegan*\_ *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 95(26): 15502-15507.
- Morris J. C; Drew M. E; Klinbeil M. M; Motyka S. A; Saxowsky T. T; Wang Z; Englund P (2001). Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. *Int J Parasitol* 31: 453-458.
- Mutomba M; Wang C (1998). The role of proteolysis during differentiation of *Trypanosma brucei* from the bloodstream to the procyclic forma. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 93: 11-22.
- Nilsen T. W (1995). Trans-splicing: an update. *Mol Biochem Parasitol* 73: 1-6

- Nozaki T; Toh-e A; Fujii M; Yagisawa H; Nakazawa M; Takeuchi T (1999). Cloning and characterization of a gene encoding phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 102:283-295
- Nozaki, T; Cross G. A (1995). Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 75, 55-67.
- Panda S; Sato T. K; Hampton G.M; Hogenesch J. B. (2003). An array of insights: application of DNA chip technology in the study of cell biology. *TRENDS in Cell biology* 13:151-156.
- Pickart C. M; Cohen R. E. (2004). Proteasome and their kin: proteases in machine age. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 5: 177-187.
- Pickart C.M (2001). Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell* 8, 499-504.
- Paugam A; Belteau Anne-Laure; Camet-Dopouy J; Crezeut C; Friguet B (2003). Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *TRENDS in Parasitology* 19: 55-59.
- Pollack J.R; Iyer V. R. (2002). Characterizing the physical genome. *Nature Genetics* supp 32: 515-521.
- Puigbó J.J; Acquatella H; Giordano H; Suárez C (1993). Analisis de los factores de riesgo em la cardiopatía chagásica crónica. Em: Madoery, R., Madoery, C., Cámara, M. L. (orgs.). *Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires, Congreso Nacional de Medicina, pp 57-78.
- Rassi A; Rassi J. A; Rassi G. G (2000). Fase aguda. Em: *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Zigman Brene, Zilton Andrade e Manoel Barral-Neto ed. Guanabara Koogan.
- Saeki Y; Sone T; Toh-e A; Yokosawa H (2002). Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of 26S proteasome. 296: 813-819.

- Saito R. M; Elgort M. G; Campbell D. A (1994). A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentole* mini-exon gene. *EMBO J* 13: 5460-5469.
- Shapiro T.A; Englund P.T (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Ver. Microbiol.*, 49: 117-143.
- Schmuñis G.A (2000). A Tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. Em: *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. Zigman Brenner; Zilton Andrade & Manoel Barral-Neto ed. Guanabara Koogan.
- Schwarz S; Rosa J; Sheffner M (1998). Characterization of human HECT domain family members and their interaction with Ubch5 and Ubch7. *Journal Biology Chemistry* 273:121148-54.
- Schwartz D; Hochstrasser M (2003) A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *TRENDS in parasitology* 28:321-328.
- Schwartz D; Cantor C. R (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
- Schaub G. A (1994). Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitology Today* 10, 463-468.
- Soares L; Seroogy C; Skreta H; Anandasabapathy N; Lovelace P; Chung Chang D; Angleman E; Fathman G (2003). Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. *Nature Immunology* .1-10.
- Sommer T; Jentsch S (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* 365:176-179.
- Southern E; Mir K; Shchepinov M (1999). Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics* sup 21(1): 5-9.
- Sutton R. E; Boothroyd J. C (1986). Evidence for trans-splicing in trypanosomes. *Cell* 47: 527-535.



- Swindle J; Tait A, (1996). Trypanosomatid genetics. In: Molecular Biology of Parasitic Protozoa by Deborah F Smith N and Marilyn Parsons, IRL Press, Oxford University Press.
- Schürch N; Furger A; Kurath U; Roditi I (1997). Contributions of the procyclin 3' untranslated region and coding region to regulation of expression in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 89: 109-121.
- Steinmetz L. M; Davi R. W (2004). Maximizing the potential of functional genomics. *Nature Genetics Reviews* 5: 156-201.
- Teixeira S. M; Kirchhoff L. V; Donelson J. E (1995). Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 270, 22586-94.
- Teixeira S.M.R; Kirchhoff L.V; Donelson J.E (1999). *Trypanosoma cruzi*: suppression of tuzin gene expression by its 5'UTR and spliced leader addition site. *Exp Parasitol* 93: 143-151.
- Tyler K. M; Engman D. M (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 31: 472-481.
- Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 6(6):509-19.
- Van Hellemond J; Motran J. C (2000). The CYC3 gene of *Trypanosoma brucei* encodes with a cyclin with a short half-life. *Molecular Biochemical Parasitology* 111: 275-282.
- Vanhamme L; Pays E. (1995). Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev* 59, 223-40.
- Vassella E; Reuner B; Yutzy B; Boshart M (1997). Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J Cell Sci* 110: 2661-2671.

- Venter JC; Adams M. D; Sutton G. G; Kerlavage A. R; Smith H. O; Hunkapiller M (1998). Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 280(5369): 1540-1542.
- Walder J. A; Eder P. S; Engman, D. M; Brentano S. T; Walder R. Y; Knutzon D. S; Dorfman D. M; Donelson J. E (1986). The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's. *Science* 233, 569-71
- Weissman A (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2:169-178.
- Whitby F. G; Xia G; Pickart C. M; Hill C. P (1998). Crystal structure of human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes. *The Journal Biology Chemistry* 273:34983-34991.
- Wilkinson K (2000). Ubiquitination and deubiquitination: target of proteins for degradation by the proteasome. *Semin. Cell. Dev. Biol* 11: 141-148.
- Zhou P; Bogacki R; McReynolds L; Howley P (2000). Harnessing the ubiquitination machinery to target the degradation of specific cellular proteins. *Molecular Cell* 6: 751-756.
- Zomerdjik J.C.B; Quellete M; Asbroek A. L.M; Kieft R; Bommer A.M; Clayton C. E; Borst P (1990). The promoter for a variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 9: 2791-2801.
- Zou Chun-Bin; Shimada-Nakajima J; Nara T; Aoki T (2000). Cloning and functional expression of Rpn1, a regulatory-particle non-ATPase subunit, of proteasome from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical Parasitology* 110: 323-331.
- Yao Y; Huang L; Krutchinsky A; Wong M; Standing K; Burlingame A; Wang C (1999). *The Journal Biology Chemistry* 274: 33921-33930.